

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/058815 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C07K 14/435**, C12Q 1/68,  
C12N 15/63, C07K 16/18, G01N 33/50, A01K 67/027,  
A61K 48/00, 38/00, 39/00, C12N 15/12

Résidence Parc d'Alco, Appt 125, F-34080 Montpellier  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003895

(74) Mandataire : **CABINET ORES**; 36 rue de St Péters-  
bourg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :  
24 décembre 2003 (24.12.2003)

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/16648 24 décembre 2002 (24.12.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Cedex  
16 Paris (FR).

**Publiée :**

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **GIORGI,**  
**Dominique** [FR/FR]; 391 rue du Mas du Juge, F-34980  
Saint Gely du Fesc (FR). **ROUQUIER, Sylvie** [FR/FR];  
391 rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR).  
**SAFFIN, Jean-Michel** [FR/FR]; 59 rue Michel Teule,

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(54) Title: NOVEL CENTROSOME-ASSOCIATED PROTEIN AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a novel centrosome-associated protein, to the polynucleotide coding for the aforementioned protein and to the applications of said protein and polynucleotide. The overexpression of the inventive protein disrupts the mitotic spindle assembly and leads to aberrant and abortive mitoses.

(57) Abrégé : L'invention est relative une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide. La surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives.

WO 2004/058815 A2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS.

La présente Invention est relative à une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide.

Le processus de division cellulaire consiste en une division nucléaire (mitose) suivie d'une division cytoplasmique (cytokinèse). La mitose est dominée par la formation d'un fuseau polaire très organisé (le fuseau mitotique) constitué de deux familles de microtubules : les microtubules polaires et les microtubules kinétochoriens. Les microtubules sont des polymères composés de sous-unités d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline. Leur croissance est initiée dans la région périphérique du centrosome par un complexe contenant majoritairement une protéine apparentée, la  $\gamma$ -tubuline. Les microtubules polaires sont composés de rangées de microtubules et de protéines associées qui sont mises en place par les deux centres mitotiques, associés à des centrioles, situés aux pôles opposés du fuseau (asters). Chaque chromosome répliqué est constitué de deux chromatides sœurs reliées entre elles par le centromère. Les microtubules kinétochoriens sont liés aux chromosomes répliqués par des structures spécialisées appelées kinétochores qui se forment au cours de la prophase sur chacune des deux faces du centromère. Les chromosomes se condensent pendant la prophase et forment les microtubules kinétochoriens qui commencent à interagir avec les microtubules polaires du fuseau après rupture de l'enveloppe nucléaire au cours de la prométaphase. Sous l'effet de la tension due aux forces opposées, dirigées vers les pôles qui tirent les microtubules kinétochoriens, les chromosomes s'alignent dans la zone équatoriale du fuseau pendant la métaphase. A l'anaphase, sous l'effet de forces continuellement développées au sein du fuseau mitotique, les chromatides sœurs se détachent et sont attirées vers les pôles opposés. Dans le même temps, les deux pôles cellulaires s'écartent. Au cours de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme à la surface de chaque groupe de chromosomes.

La division cellulaire s'achève au moment où le contenu cytoplasmique est divisé selon le processus de cytokinèse. Le fuseau mitotique joue un rôle important dans le processus de cytokinèse, en fixant la mise en place de la segmentation cellulaire. Le sillon de division apparaît invariablement dans le plan de la plaque équatoriale, perpendiculairement à l'axe du fuseau mitotique.

Les processus décrits ci-dessus sont finement régulés par un équilibre entre des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Lorsque la cellule entre en mitose, des changements importants dans la phosphorylation des protéines interviennent. Le centrosome et le fuseau mitotique sont particulièrement enrichis en sites phosphorylés. De nombreuses protéine-kinases, particulièrement des sérine-thréonine-kinases, ont été décrites comme intervenant dans ces processus de phosphorylation (voir à cet égard Giet R. et Prigent C., J. Cell Science, 112, 3591-3601, 1999). Parmi celles-ci on citera celles localisées au niveau des centrosomes, parmi lesquelles les kinases de type aurora, requises pour la séparation des centrosomes et l'assemblage du fuseau mitotique, les kinases de type polo, impliquées dans la maturation et la formation du fuseau bipolaire et les kinases de type NIMA qui régulent la séparation des centrosomes.

Les mammifères possèdent au moins trois protéine-kinases du type aurora. Chez l'homme, ces trois protéine-kinases sont surexprimées dans des pathologies cancéreuses du fait d'anomalies chromosomiques. Ainsi, ces protéines semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la ploïdie. Par exemple, une inactivation ou une surexpression de deux de ces kinases conduit à une polyploïdie. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora A conduit à la formation de fuseaux monopolaires. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora B conduit à la formation de cellules multinucléées par défaut de cytokinèse. Ces anomalies chromosomiques apparaissent liées à des perturbations dans la formation du fuseau mitotique.

Les partenaires et les substrats de ces protéine-kinases sont encore peu connus. Par exemple, chez le xénope, aurora A interagit avec une kinésine impliquée dans la dynamique des microtubules. Chez l'homme, elle

phosphoryle la protéine HsTACC-3, également surexprimée dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Chez la drosophile, aurora A phosphoryle la protéine D-TACC et est nécessaire à sa localisation aux centrosomes afin de réguler les microtubules astraux. D-TACC interagit avec  
5 la protéine associée aux microtubules (MAP : Microtubule Associated Protein) Msp, qui fait partie de la famille des protéines XMAO215/ch-TOC/Msps, qui stimulent la croissance des microtubules *in vitro* et sont concentrées au niveau des centrosomes *in vivo*. D-TACC et Msp coopèrent pour stabiliser les centrosomes. Le terme MAP regroupe une collection de protéines variées  
10 définies sur la base de leur capacité à interagir avec les microtubules. Les MAP apparaissent comme des partenaires/substrats des kinases du centrosome comme aurora ou polo.

Une division cellulaire correcte nécessite une coordination entre la ségrégation des chromosomes par le fuseau mitotique et le clivage de  
15 la cellule par l'appareil de cytokinèse. Les microtubules du fuseau mitotique jouent un rôle essentiel dans les deux processus.

Cependant, malgré l'ensemble des travaux réalisés sur la division cellulaire, les facteurs intervenant dans une mise en place correcte du fuseau mitotique et/ou au contraire perturbant sa mise en place et/ou sa  
20 structure, entraînant ainsi les conséquences ci-dessus décrites ne sont toujours pas connus.

Une telle connaissance permettrait d'une part de mieux comprendre les mécanismes de la mitose et d'autre part de pouvoir développer des moyens de lutter contre les anomalies de la division cellulaire et les  
25 conséquences qu'elles entraînent.

C'est dans ce domaine que se place la présente Invention.

En effet, de manière surprenante et inattendue, les Inventeurs ont mis en évidence une nouvelle protéine humaine associée aux centrosomes. Par immunofluorescence, elle est détectée en colocalisation avec l' $\alpha$ -  
30 tubuline des microtubules du fuseau mitotique, en particulier avec l'aster. Cette protéine a été nommée ASAP pour Aster Associated Protein (Protéine Associée à l'Aster) par les Inventeurs.

La surexpression de la protéine selon l'Invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires). Sa surexpression bloque la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire.

Ainsi, l'Invention a pour objet une protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1 ;

b) une protéine présentant, sur la totalité de sa séquence, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou au moins 95% de similarité, avec la protéine de SEQ ID NO: 1.

Une protéine conforme à l'Invention se caractérise par les propriétés suivantes :

- elle présente un poids moléculaire compris entre 60 et 100 kDa, de préférence entre 65 et 80 kDa ;
- elle est associée aux centrosomes ;
- elle est colocalisée par immunofluorescence avec l' $\alpha$ -tubuline des microtubules du fuseau mitotique ;
- elle présente une faible identité (23%) avec la protéine MAP1A (Microtubule Associated Protein 1A) ;
- elle présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine s'oligomériser, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines ;
- elle présente une faible identité (20%), entre les acides aminés 300 et 600 avec un domaine de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 : 1112-1121, 2000), référencé pfam00769 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam00769>), et, entre les acides aminés 480 et 630, avec un domaine de type ERM

(Ezrin/radixin/moesin ; Louvet-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), référencé pfam02029 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam02029>). Les protéines caldesmon et ERM sont également considérées comme des MAP ;

5                   - elle présente également, entre les positions 65 et 303, un domaine BRCT, (Breast cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J., 11, 68-76 (1997)), indiquant que la protéine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire ;

10                   - elle présente une grande richesse en hélices  $\alpha$  dans sa partie C-terminale, en particulier dans la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formée d'hélices  $\alpha$ .

Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

15                   Les protéines selon l'Invention incluent toute protéine (naturelle, synthétique, semi-synthétique ou recombinante) de n'importe quel organisme procaryote ou eucaryote, notamment d'un mammifère, comprenant ou consistant en une protéine ASAP. Préférentiellement, ladite protéine est une protéine ASAP fonctionnelle.

20                   On entend par "fonctionnelle", une protéine possédant une activité biologique normale, c'est à dire capable d'intervenir dans l'organisation du fuseau mitotique et dans la division cellulaire. Cette protéine peut comprendre des mutations silencieuses n'induisant aucun changement substantiel dans son activité et ne produisant aucune modification phénotypique.

25                   Des protéines conformes à l'invention sont notamment représentées par les protéines ASAP humaine (SEQ ID NO : 1) et murine (SEQ ID NO : 46).

30                   Sont incluses dans les protéines selon l'Invention définies en b), les protéines variantes des séquences SEQ ID NO: 1 et 46, en particulier les protéines dont la séquence en acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, une délétion, une substitution et/ou une addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport

aux séquences SEQ ID NO: 1 et 46.

De manière préférée, les protéines variantes présentent une mutation entraînant un dysfonctionnement (activation ou inhibition) de la protéine, d'autres gènes ou protéines ou encore de la cellule en général.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'Invention, ladite protéine est une protéine de mammifère, préférentiellement une protéine d'origine humaine.

Au sens de la présente Invention les définitions suivantes s'appliquent.

10 L'identité d'une séquence par rapport à la séquence de SEQ ID NO :1 comme séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

15 Le pourcentage d'identité peut être calculé par l'Homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquences tel que, par exemple celui de la suite BLAST (Altschul et al., NAR, 1997, 25, 3389-3402).

20 Les programmes BLAST sont mis en œuvre sur la fenêtre de comparaison constituée par la totalité de la SEQ ID NO :1, indiquée comme séquence de référence.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à  
25 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles de ladite protéine de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

30 La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives,



lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente Invention, on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques ou physiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

Par "techniques ou méthodes bien connues de l'homme du métier" on entend ici se référer aux techniques ou méthodes classiquement utilisées par l'homme du métier et exposées dans de nombreux ouvrages, comme en particulier celui intitulé Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press).

La protéine selon l'Invention est obtenue soit à partir d'une cellule, soit par synthèse chimique, soit par recombinaison génétique.

Par synthèse chimique, la protéine peut être obtenue en utilisant l'une des nombreuses voies de synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Dans ce cas, la séquence de la protéine peut être modifiée afin d'améliorer sa solubilité, en particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

La protéine selon l'Invention est constituée de l'enchaînement de 13 peptides correspondants aux produits de traduction de 13 des 14 exons

que comporte le gène correspondant, le premier exon n'étant pas traduit (voir ci-après).

De manière plus précise, lesdits peptides répondent aux séquences suivantes (positions données par rapport à la numérotation de la

5 séquence SEQ ID NO: 1) :

- Peptide 1 : il comprend 25 acides aminés correspondants aux positions 1 à 25 (SEQ ID NO: 2) ;

- Peptide 2 : il comprend 28 acides aminés correspondants aux positions 26 à 53 (SEQ ID NO: 3) ;

10 - Peptide 3 : il comprend 107 acides aminés correspondants aux positions 54 à 160 (SEQ ID NO: 4) ;

- Peptide 4 : il comprend 76 acides aminés correspondants aux positions 161 à 236 (SEQ ID NO: 5) ;

15 - Peptide 5 : il comprend 31 acides aminés correspondants aux positions 237 à 267 (SEQ ID NO: 6) ;

- Peptide 6 : il comprend 83 acides aminés correspondants aux positions 268 à 350 (SEQ ID NO: 7) ;

- Peptide 7 : il comprend 24 acides aminés correspondants aux positions 351 à 374 (SEQ ID NO: 8) ;

20 - Peptide 8 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 375 à 428 (SEQ ID NO: 9) ;

- Peptide 9 : il comprend 32 acides aminés correspondants aux positions 429 à 460 (SEQ ID NO: 10) ;

25 - Peptide 10 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 461 à 514 (SEQ ID NO: 11) ;

- Peptide 11 : il comprend 49 acides aminés correspondants aux positions 515 à 563 (SEQ ID NO: 12) ;

- Peptide 12 : il comprend 43 acides aminés correspondants aux positions 564 à 606 (SEQ ID NO: 13) ;

30 - Peptide 13 : il comprend 41 acides aminés correspondants aux positions 607 à 647 (SEQ ID NO: 14).

La présente Invention a aussi pour objet un peptide constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine définie ci-dessus en a) ou b), particulièrement un peptide sélectionné parmi :

- les séquences correspondant aux peptides 1 à 13 décrits ci-dessus, c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 14, et

- les séquences SEQ ID NO : 47 à 53 correspondant à des mutants de la protéine hASAP délétés de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT (Ndel1 : résidus 304 -647 (SEQ ID NO: 48) ; Ndel2 : résidus 411-647 (SEQ ID NO : 49) ; Ndel3 : résidus 478-647 (SEQ ID NO : 50)) ou de la partie C-terminale contenant le domaine MAP (Cdel1 : résidus 1 à 477 (SEQ ID NO: 51) ; Cdel2 : résidus 1 à 418 (SEQ ID NO: 52) ; Cdel3 : résidus 1 à 303 (SEQ ID NO: 53) ; résidus 1 à 421 (SEQ ID NO: 47)).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit peptide est utile pour la production d'anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine telle que définie ci-dessus, préférentiellement reconnaissant la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

L'Invention a ainsi également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'Invention.

De manière préférentielle selon l'Invention, les anticorps reconnaissent, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

Les anticorps selon l'Invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal délectable et/ou quantifiable.

Lesdits anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain ou à partir de sérum d'animaux immunisés avec les protéines ou les peptides selon l'Invention. Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon les techniques bien connues de l'Homme du Métier.

L'Invention a également pour objet l'utilisation des anticorps selon l'Invention pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'Invention.

De manière générale, les anticorps selon l'Invention peuvent  
5 être avantageusement utilisés pour détecter la présence d'une protéine selon l'Invention, normale ou mutée.

Particulièrement, les anticorps monoclonaux, peuvent être utilisés pour la détection de ces protéines dans un échantillon biologique. Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immuno-  
10 histochimique de l'expression des protéines selon l'Invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID NO: 1, sur des coupes de tissus. Généralement pour de telles analyses, les anticorps utilisés sont marqués afin d'être détectables par exemple par des composés immunofluorescents, par marquage à l'or ou sous forme d'immunoconjugués enzymatiques.

15 Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces protéines dans les tissus ou prélèvements biologiques et ainsi permettre la détection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou  
20 multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'Invention.

L'Invention a également pour objet une méthode de détection dans un échantillon biologique de la protéine selon l'Invention, particulièrement de la protéine ASAP, comprenant une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre  
25 accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention et une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

Cette méthode peut en outre permettre de mesurer le taux  
30 d'expression de la protéine selon l'Invention dans des cellules, particulièrement dans des cellules cancéreuses. L'étude de l'expression de la protéine ASAP (sur- ou sous-expression) est un élément d'évaluation de la capacité de

prolifération ou d'agressivité (capacité à évoluer vers des cancers de mauvais pronostic) de cellules cancéreuses.

L'Invention a donc également pour objet une méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité des cellules cancéreuses contenues dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention, une troisième étape de mise en évidence et/ou de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique contenant des cellules présentant un taux de protéines normal ou altéré, auquel ladite méthode est appliquée dans les mêmes conditions.

L'Invention a également pour objet une trousse permettant de mettre en œuvre l'une quelconque des méthodes ci-dessus décrites comprenant :

- a) au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'Invention ;
- b) les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, la trousse peut éventuellement comprendre des réactifs nécessaires pour rendre accessible le milieu intracellulaire.

Par moyen pour rendre accessible le milieu intracellulaire, on entend tout moyen connu de l'Homme du Métier comme par exemple la lyse cellulaire par voie enzymatique, chimique ou encore la sonication, la perméation membranaire, les chocs thermiques.

La présente Invention a également pour objet un polynuéclotide isolé (ADNc ou fragment d'ADN génomique), caractérisé en ce que sa séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences codant pour une protéine ou un peptide  
5 tels que définis ci-dessus, et
- les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

L'Invention englobe, les allèles du gène *asap* issus de n'importe quel mammifère, ainsi que les polynuéclotides des mutants naturels  
10 ou artificiels du gène *asap* codant pour une protéine ASAP, particulièrement pour une protéine ASAP fonctionnelle telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit polynuéclotide codant pour une protéine ASAP répond à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- 15 - la séquence SEQ ID NO: 15, correspondant à l'ADN complémentaire de 2575 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine ASAP humaine (hASAP) ;
- la séquence SEQ ID NO: 45, correspondant à l'ADN complémentaire de 2767 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine  
20 ASAP murine (mASAP)
- le fragment d'ADN génomique de 29750 nucléotides répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 16, correspondant au gène *asap* humain comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant  
25 pas traduit, contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb).

30 La séquence SEQ ID NO: 16 est contenue dans le clone BAC RP11-27G13 (Osoegawa, K., et col., (2001) A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing the Complete Human Genome, Genome Research,

Vol. 11, n°3, 483-496, mars 2001). Les séquences contenues dans le contig AC097467 et dans le clone BAC RP11-27G13 ont été obtenues dans le cadre du programme de séquençage du génome humain et n'ont jusqu'à présent fait l'objet d'aucune reconnaissance ni caractérisation précises permettant de leur attribuer une quelconque fonction. Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées. En fait, le polynucléotide isolé par les Inventeurs présente de longs enchaînements de désoxyadénosines (poly-dA), ce qui explique les difficultés rencontrées par les Inventeurs pour obtenir l'ADNc complet par utilisation d'amorces oligo-désoxythymidines (oligo-dT) classiques, celles-ci s'hybridant

de manière aléatoire avec les enchaînements poly-dA. C'est par l'utilisation répétée de la technique de l'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (3' Rapid Amplification cDNA end ou 3'RACE) que les Inventeurs sont parvenus à isoler le polynucléotide correspondant à l'ARNm complet.

5 L'ARNm, correspondant au polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 15, est spécifiquement exprimé dans le testicule sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 2,9 kilobases et dans le cerveau sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 9 kilobases pouvant correspondre soit à un pré-messager soit à une isoforme de haut poids moléculaire.

10 De manière plus précise, lesdits exons sont répartis comme suit sur ladite séquence génomique (par rapport à la numérotation de la séquence SEQ ID NO: 16) :

- 15 - exon 1 : il comprend 200 paires de bases correspondant aux positions 101 à 300 (SEQ ID NO: 17) ;
- exon 2 : il comprend 139 paires de bases correspondant aux positions 1157 à 1295 (SEQ ID NO: 18) ;
- exon 3 : il comprend 85 paires de bases correspondant aux positions 2050 à 2134 (SEQ ID NO: 19) ;
- 20 - exon 4 : il comprend 321 paires de bases correspondant aux positions 3615 à 3935 (SEQ ID NO: 20) ;
- exon 5 : il comprend 227 paires de bases correspondant aux positions 8259 à 8485 (SEQ ID NO: 21) ;
- exon 6 : il comprend 94 paires de bases correspondant aux positions 14930 à 15023 (SEQ ID NO: 22) ;
- 25 - exon 7 : il comprend 248 paires de bases correspondant aux positions 16715 à 16962 (SEQ ID NO: 23) ;
- exon 8 : il comprend 71 paires de bases correspondant aux positions 19552 à 19622 (SEQ ID NO: 24) ;
- 30 - exon 9 : il comprend 169 paires de bases correspondant aux positions 21187 à 21355 (SEQ ID NO: 25) ;



- exon 10 : il comprend 90 paires de bases correspondant aux positions 21911 à 22000 (SEQ ID NO: 26) ;
- exon 11 : il comprend 162 paires de bases correspondant aux positions 23731 à 23892 (SEQ ID NO: 27) ;
- 5       - exon 12 : il comprend 146 paires de bases correspondant aux positions 24014 à 24159 (SEQ ID NO: 28) ;
- exon 13 : il comprend 133 paires de bases correspondant aux positions 24343 à 24475 (SEQ ID NO: 29) ;
- exon 14 : il comprend 485 paires de bases correspondant aux  
10 positions 29166 à 29650 (SEQ ID NO: 30).

L'invention a aussi pour objet :

- un fragment de l'un quelconque des polynucléotides selon l'invention, d'au moins 15 à 1500 nucléotides consécutifs à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et  
15 des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132,  
20 AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293,  
25 BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418,  
30 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans

la base de données GenBank, particulièrement un fragment sélectionné parmi les séquences correspondants aux exons c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO: 16 à SEQ ID NO: 30 ;

- un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, avec l'un des polynucléotides selon l'Invention.

La définition de l'identité d'une séquence donnée précédemment pour les protéines, s'applique par analogie aux molécules d'acide nucléique.

- 10 Sont inclus dans un polynucléotide présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence au moins 90 %, selon l'Invention, les polynucléotides variants des séquences SEQ ID NO: 15 et 45, c'est-à-dire l'ensemble des polynucléotides correspondants à des variants alléliques, c'est-à-dire à des variations individuelles des séquences SEQ ID NO: 15 et
- 15 45. Ces séquences variantes naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie.

- On entend également désigner par polynucléotide variant, tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou d'une variation d'un site
- 20 d'épissage de la séquence génomique dont l'ARNm a comme ADN complémentaire le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO : 45.

- De préférence, la présente Invention concerne les polynucléotides ou les fragments variants des séquences SEQ ID NO: 15 et 45, particulièrement ceux dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence en acides aminés des protéines de séquence SEQ ID
- 25 NO: 1 et SEQ ID NO : 46.

- Les polynucléotides selon l'Invention peuvent être isolés à partir de cellules, particulièrement des cellules de testicule ou de cerveau ou à partir de banques d'ADN cellulaire. Ils peuvent également être obtenus par
- 30 une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) effectuée sur l'ADN total des cellules ou encore par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux des cellules ou par synthèse chimique.

Les polynucléotides selon l'invention, particulièrement les fragments de l'un quelconque des polynucléotides selon l'invention, et les séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, 5 AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, 10 BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, 15 BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, 20 BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou leurs fragments, peuvent notamment être utilisés comme sondes ou comme amorces pour détecter/amplifier des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide 25 selon l'invention, particulièrement dans d'autres organismes.

Les transcrits du gène *asap* sont par exemple de préférence mis en évidence à l'aide de sondes sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 17 à SEQ ID NO: 44 ou à l'aide d'un EST tel que défini ci-dessus ou amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces sélectionnées dans le groupe constitué par les 30 séquences SEQ ID NO: 31 à 43.

Le polynucléotide selon l'invention peut permettre de diagnostiquer un état pathologique ou une maladie génétique impliquant un dysfonctionnement du gène *asap* et de cribler des substances capables de moduler (activer ou inhiber) la transcription dudit gène.

5 L'invention a aussi pour objet les polynucléotides susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide des amorces selon l'invention.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir  
10 un signal délectable et/ou quantifiable.

Le marquage des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou l' $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la  
15 biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémo-luminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en œuvre  
20 notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (U.S. N° 4,683,202). D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplifica-  
25 tion) ou technique d'amplification à déplacement de brin, la technique TAS (Transcription-based Amplification System), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction), la technique de RCR (Repair Chain  
30 Reaction), la technique CPR (Cycling Probe Reaction), la technique d'amplification à la Q- $\beta$ -réplicase. On peut encore citer la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

Ces techniques sont bien entendu parfaitement connues de l'homme du métier.

Comme sondes ou comme amorces, les différents polynucléotides selon l'Invention peuvent permettre, soit de déterminer le profil de transcription du gène *asap* correspondant ou une éventuelle altération de ce profil dans un échantillon biologique, soit de mettre en évidence le gène correspondant dans d'autres espèces, des variants alléliques de ce gène ou une éventuelle altération fonctionnelle de ce gène (changement substantiel dans l'activité de la protéine codée par ledit gène) résultant d'une mutation (insertion, délétion ou substitution) d'un ou plusieurs nucléotides au niveau d'au moins un exon dudit gène. De telles mutations incluent en particulier les délétions, les insertions ou les substitutions non-conservatives au niveau de codons correspondant à des résidus d'acides aminés situés dans un domaine essentiel pour l'activité biologique de la protéine.

Ainsi l'Invention a pour objet une méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'Invention ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde selon l'Invention, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Par conditions classiques d'hybridation, on entend celles décrites dans Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape de transcription inverse et d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

Ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène peut en outre comporter une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison avec un échantillon témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique  
5 présentant une transcription normale ou altérée du gène correspondant au polynucléotide selon l'invention auquel ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène est appliquée dans les mêmes conditions.

L'invention a aussi pour objet une méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide  
10 selon l'invention ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir des cellules d'un échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde selon l'invention, préalablement marquée, dans  
15 des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une  
20 étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés. La méthode peut éventuellement comporter une quatrième étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

L'invention a également pour objet une trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes précédemment décrites comprenant :

25 a) au moins une sonde ou une paire d'amorces selon l'invention ;

b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

30 c) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification ;

d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou au dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

5 Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus. Elle peut également contenir les réactifs nécessaires à la purification des acides nucléiques à partir de l'échantillon biologique.

Le polynucléotide de l'Invention ou un de ses fragment, ainsi que les EST décrits précédemment ou leur fragments peuvent servir à la mise au point de  
10 modèles cellulaires ou animaux n'exprimant pas la protéine ASAP, en invalidant le gène *ASAP* par la méthode de Si RNA (ou RNAi pour RNA interference ; M. McManus and P. Sharp, Nature Reviews Genetics, 3, 737-747, 2002 ; V. Brondani, F. Kolb, E. Billy, M/S, 6-7, 665-667, 2002) à l'aide d'oligonucléotides dérivés de leurs séquences.

15 L'Invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré le polynucléotide selon l'Invention.

Un tel vecteur peut contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion de la protéine dans une cellule hôte.

20 Lesdits vecteurs comportent de préférence : un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement comprendre des séquences codant pour des signaux particuliers spécifiant la  
25 sécrétion de la protéine traduite tels que par exemple un promoteur fort de nature ubiquitaire ou un promoteur sélectif d'un type de cellule et/ou de tissu particulier. Ces différentes séquences de contrôle sont choisies en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

Le polynucléotide selon l'Invention peut être inséré dans des  
30 vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral. Les vecteurs viraux peuvent notamment être des adénovirus, des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques. L'homme du  
5 métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus ou les virus associés aux adénovirus (Adeno-associated virus ou AAV).

10 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN ou l'ARN nu, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expres-  
15 sion dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les vecteurs recombinants en résultant peuvent être introduits dans l'hôte approprié par des méthodes standards, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion  
20 cellulaire.

L'invention a aussi pour objet les cellules hôtes transformées, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'invention ou au moins un vecteur selon l'invention a été introduit.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes, les cellules de levure, les  
30 cellules animales, en particulier les cellules de mammifères ou encore les cellules végétales. On peut citer également les cellules d'insectes dans



lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en oeuvre des baculovirus.

L'Invention a également pour objet les organismes transgéniques non-humains tels que les animaux ou les végétaux transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient le polynucléotide selon l'Invention ou le vecteur selon l'Invention, sous une forme libre ou intégrée.

De préférence selon l'Invention, les organismes transgéniques non-humains sont ceux porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'Invention, non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

Selon l'Invention les animaux transgéniques sont de préférence des mammifères, excepté l'homme, plus préférentiellement les rongeurs, en particulier les souris ou les rats.

Les animaux transgéniques peuvent être obtenus par toute méthode classique connue de l'homme du métier, comme par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les cellules hôtes transformées, les animaux ou les végétaux transgéniques selon l'Invention peuvent ainsi exprimer ou surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'Invention ou leur gène homologue ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation.

Les cellules de testicule ou de cerveau, les cellules hôtes transformées ou les organismes transgéniques selon l'Invention peuvent être utilisés pour la préparation de la protéine selon l'Invention.

La protéine selon l'Invention, particulièrement la protéine ASAP native, peut être purifiée selon les techniques connues de l'homme du métier. Ainsi, la protéine peut être purifiée à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, particulièrement de chromatographie d'affinité, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

L'Invention a également pour objet une méthode de préparation de la protéine ASAP, se caractérisant en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la présente Invention, notamment les cellules de mammifères ou les cellules d'organismes transgéniques selon l'Invention, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

Comme technique de purification, on peut citer par exemple la chromatographie d'affinité sur glutathione-sépharose (ou agarose) telle que décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

L'Invention a également pour objet une protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par l'une quelconque des méthodes de préparation ci-dessus décrites.

L'Invention a encore pour objet une méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention et
- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention.

La présente invention a également pour objet une méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine ASAP, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine ASAP avec une substance à tester,
- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP, et
- dans une troisième étape on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.

Au sens de la présente invention, on entend par activité de la protéine ASAP, aussi bien l'expression de la protéine ASAP ou des transcrits (ARNm) correspondants, que l'activité biologique de ladite protéine ASAP, comme par exemple son effet sur l'organisation du fuseau mitotique ou  
5 l'induction de mitoses aberrantes et abortives.

La détection du complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine ou la mesure de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP peuvent être réalisées par les techniques classiques d'analyse d'ARNm ou de protéines qui sont connues en  
10 elles-mêmes ; à titre d'exemple non-limitatif, on peut citer les techniques suivantes : RT-PCR, Northern-blot, Western-blot, RIA, ELISA, immunoprécipitation, techniques d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique.

Avantageusement, ladite mesure est réalisée à l'aide des sondes, des amorces ou des anticorps, tels que définis ci-dessus.

15 : De telles substances peuvent être des macromolécules biologiques comme par exemple un acide nucléique, un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques ou encore des molécules chimiques.

20 L'invention a également pour objet le polynucléotide, la protéine, les anticorps, les vecteurs ou les cellules transformées selon l'invention, utilisés comme médicaments.

Comme indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'invention bloque la division cellulaire et par conséquent la  
25 prolifération cellulaire. Cela en fait un excellent candidat pour une utilisation comme agent anti-mitotique, utilisable par exemple dans le traitement des pathologies cancéreuses.

Ainsi, l'invention a également pour objet l'utilisation du polynucléotide, d'un vecteur ou de la protéine selon l'invention, dans la prépara-  
30 tion d'un médicament anti-mitotique.

De même comme il est également indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans

l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires).

Ainsi, l'Invention a aussi pour objet l'utilisation d'un polynucléotide anti-sens ou d'un fragment anti-sens, d'un anticorps, d'un vecteur  
5 contenant un oligonucléotide anti-sens selon l'Invention, capables d'inhiber l'expression du polynucléotide ou de la protéine selon l'Invention, dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou  
10 multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'Invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'Invention ainsi qu'aux  
dessins annexés, dans lesquels :

15 - La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

- La Figure 2 représente les signaux obtenus par Northern blots sur différents tissus humains après hybridation avec une sonde hASAP.

- La Figure 3 représente les résultats obtenus :  
20 (A) par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR obtenus avec des amorces correspondant au polynucléotide de souris, orthologue du polynucléotide SEQ ID NO: 15, à partir de différents tissus de souris.

(B) Après transfert du gel après électrophorèse sur une  
25 membrane et hybridation avec une sonde mASAP interne.

- La Figure 4 représente la localisation cellulaire de la protéine hASAP couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP) en 3' ou la Yellow Fluorescent Protein (YFP) en 5' ou à un tag MYC du côté N-terminal (colonne fusion).

30 Les noyaux sont colorés à l'iodure de propidium ou au Hoechst 33286. (4A : objectif 63x ; 4B, 4C, 4D : objectif 100X).

- La Figure 5 montre la co-localisation de la protéine ASAP

humaine avec l'alpha-tubuline. Figure 5 A : localisation cellulaire de l'alpha-tubuline, Figure 5 B : localisation de la protéine ASAP, Figure 5 C : superposition des 2 images montrant la colocalisation des 2 protéines.

Les exemples suivants sont illustratifs de l'invention et ne la limitent aucunement.

**EXEMPLE 1 : Construction de la séquence codante ASAP complète :**

On amplifie la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP à partir de 2 fragments chevauchants :

- un fragment A amplifié par PCR à partir du clone AI885274 avec les amorces :

constFIS-1F (5'-ATGTCTGATGAAGTTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 31) et

constFIS-2R (5'-AGGCCTCAAATGATGCTAATGC-3') (SEQ ID NO: 32) ;

- un fragment B amplifié à partir du clone AI671785 avec les amorces :

constFIS-2F (5'-ATCATTTGAGGCCTGGAAGGC-3') (SEQ ID NO: 33) et

et constFIS-1R (5'-AAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 34).

Puis, pour obtenir un produit PCR unique correspondant à la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP, utilisable pour les expériences de fonction, 0,5 µl des produits de chacune des 2 réactions PCR (fragment A et B) sont hybridés ensemble à 25°C puis amplifiés avec les amorces constFIS-1F et constFIS-2F. Ce produit PCR est sous-cloné dans le vecteur PCR4 suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen) et vérifié par séquençage.

Les difficultés majeures rencontrées se sont situées dans la détermination *in silico* de la séquence codante complète ASAP et de sa reconstruction *in vitro*. En particulier, le choix des amorces et des différentes PCR de la région 3' ont été délicats en raison de la richesse de la séquence en polyA.

**EXEMPLE 2 : Analyse bio-informatique**

La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

L'organisation complète du gène *asap* et sa localisation chromosomique ont été obtenues en comparant la séquence de l'ADNc obtenu à l'exemple 1, à la séquence du génome humain en utilisant les programmes du Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.ensembl.org/genome/central/> et plus précisément le programme de recherche BLAST (<http://genome.cse.ucsc.edu/>).

Le gène humain *asap* est constitué de 29750 nucléotides comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant pas traduit. La taille des exons s'échelonne de 71 à 321 paires de bases. La séquence du gène est contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), et est par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb). La séquence du gène est physiquement contenue dans le clone BAC RP11-27G13.

Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289,

BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, 5 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et 10 n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées.

La séquence protéique a été comparée aux séquences des banques de données en utilisant les programmes PSI-BLAST et PHI-BLAST du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/>). Des motifs protéiques consensus ont été recherchés en utilisant les programmes DART du NCBI et 15 SMART d'ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/#similariv>), dont les paramètres permettent de détecter des motifs de faible homologie. La protéine ASAP présente une identité de séquence de 23% sur le tiers C-terminal avec une protéine associée aux microtubules (MAP 1A pour Microtubule-Associated-Protein 1A). Par ailleurs la recherche de motifs 20 conservés (DART on SMART) révèle des domaines de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 1112-1121, 2000) et ERM (Ezrin/radixin/moesin) (Louvét-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), qui sont des protéines également considérées comme des MAPs, avec des identités d'environ 20%. Elle présente également un domaine BRCT (Breast 25 cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J., 11, 68-76 (1997)) entre les positions 65 et 303.

La protéine ASAP présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine 30 s'oligomériser, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines.

L'analyse informatique de la protéine à l'aide des programmes accessibles dans le site internet (<http://npsa-bil.ibcp.fr/cgi->

bin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_secons.html), révèle l'absence de feuillet  $\beta$  et une très grande richesse en hélices  $\alpha$ , en particulier pour la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formées d'hélices  $\alpha$ .

5 Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

### **EXEMPLE 3 : Expression tissulaire**

#### **a) Analyse par Northern blot**

Préparation des sondes radioactives :

10 Les ADN à radiomarquer sont isolés sur gel à bas point de fusion (LMP) selon la technique décrite dans Rouquier, S. et al., (Genomics, 17, 330-340, (1993)). Environ 100 ng d'ADN ainsi isolé, sont marqués par amorçage aléatoire (fragment de Klenow, Proméga) en présence de [ $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP] (Amersham) selon la technique décrite dans Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., (Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)). Ces sondes sont purifiées  
15 sur des colonnes de Sephadex G-50 selon la technique décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Les hybridations s'effectuent durant la nuit en présence de  $2 \cdot 10^6$  Cpm/ml de sonde radioactive dénaturée.

#### **a.1) Hybridation**

20 Deux membranes Northern Blot de la société Clontech, (Human MTN Blot at Human MTN Blot II, Réf. 7760-1 et 7759-1) comportant des ARNm humains de différents tissus ont été hybridées avec l'ADNc hASAP complet marqué comme décrit ci-dessus. La membrane est hybridée en  
25 présence de formamide à 42°C, en suivant le protocole Clontech. Un contrôle d'hybridation de la membrane est réalisé avec une sonde actine. La membrane est rincée 2 fois à haute stringence en 0,1X SSC/0,1% SDS à la température de 42°C, pendant 15 minutes. Les membranes sont alors analysées par autoradiographie ou au Phosphorimager.

30 Les tissus testés sont : la rate, le thymus, la prostate, le testicule, l'ovaire, l'intestin grêle, le colon, les leucocytes sanguins, le cœur, le



cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein et le pancréas.

#### a.2) Résultats

La Figure 2 illustre ces résultats.

5 Deux signaux sont détectés :

- un signal dans le testicule à environ 2,6 kb, ce qui correspond à la taille de l'ARNm ;

- un signal dans le cerveau mais à un haut poids moléculaire (9 kb) qui correspond soit à un pré-messager, soit à une isoforme de haut poids  
10 moléculaire

#### b) Analyse par RT-PCR

Cette analyse a été effectuée sur des ARNs totaux de différents tissus de souris, à savoir le cerveau, le cœur, le colon, le foie, l'intestin grêle, le muscle squelettique, le pancréas, le poumon, le rein, la rate et le  
15 testicule.

##### b.1) Obtention de l'ADNc orthologue de souris

Les ARNs totaux de cellules de différents tissus de souris sont extraits avec le "mammalian total RNA kit" de la société Sigma. Les ARN sont rétro-transcrits avec le kit Superscript II de la société Invitrogen selon les  
20 conditions prescrites par le fournisseur et en utilisant des amorces oligodT. Les produits obtenus sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. 1 µl de chaque échantillon ainsi obtenu est à son tour amplifié par PCR (25 µl de milieu de réaction, 30 cycles (94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes)) avec des amorces spécifiques du  
25 gènes *asap* de souris (mFIS-1F, 5'-ACA ACG AAT AAC AGA GTG TCC-3' (SEQ ID NO: 35) et mFIS-2R, 5'-ACT CCT GAT AAA CAG CTG CC-3' (SEQ ID NO: 36)).

Les produits amplifiés obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, colorés au bromure d'éthidium et leur taille comparée à un marqueur de taille déposé sur le gel en parallèle.  
30

Après électrophorèse, les produits amplifiés obtenus sont transférés par capillarité sur membrane de nylon chargée, dans le tampon

NaCl 1,5M/NaOH 0,5M, selon la technique de Southern (transfert alcalin). La membrane est ensuite hybridée avec une sonde radiomarquée mASAP, (SEQ ID NO: 44), générée par amplification de la séquence contenue dans le clone de souris AW06131 sélectionné après comparaison de la séquence ASAP humaine dans les banques de données (GenBank) ([http://expression.gnf.org/promoter/tissue/images/41739\\_s\\_at.png](http://expression.gnf.org/promoter/tissue/images/41739_s_at.png)).

L'amplification a été réalisée par PCR (conditions telles que décrites ci-dessus dans lesquelles le volume de réaction est de 50 µl et le dCTP froid est à la concentration de 10 µM supplémenté avec 50 µCi d'α-P<sup>32</sup>-dCTP à 3000Ci/mmol), en utilisant les amorces mFIS-1F (SEQ ID NO: 35) et mFis-2R (SEQ ID NO: 36). Les hybridations sont réalisées à 65°C (dans du tampon 6X SSC/0,5% SDS/5X Denhardt). La membrane est rincée à forte stringence (0,1X SSC/0.1% SDS), puis analysée par autoradiographie ou au PhosphorImager.

#### 15 b.2) Résultats

La Figure 3 illustre ces résultats.

On constate qu'on obtient un signal majoritaire dans le testicule et le cerveau, nettement visible sur gel (Figure 3A).

Après transfert du gel et hybridation avec une sonde interne, on constate que l'on détecte un signal très faible dans les autres tissus (Figure 3B).

Par conséquent l'ARNm codant pour la protéine mASAP est majoritairement exprimé dans le testicule et le cerveau. L'ADNc complet de souris, amplifié par RT-PCR à partir de l'ARN de testicule de souris, correspond à la séquence SEQ ID NO : 45 et la protéine correspondante (mASAP) à la séquence SEQ ID NO : 46.

#### 25 **EXEMPLE 4 : Localisation cellulaire**

##### a) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression eucaryote

L'ADNc hASAP obtenu à l'exemple 1 est inséré dans trois vecteurs d'expression :

1- dans pEAK10-EGFP en phase avec la Green Fluorescent Protein (GFP) fusionnée en C-terminal (vecteur 1) (pEAK10, vecteur de Edge

Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France) dans lequel a été introduit la protéine EGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) suivant la référence Gaillard, I., et al., Eur. J. Neurosci., 15, 409-418, 2002) ;

2- dans pEYFP-C1 en phase avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) fusionnée du côté N-terminal (vecteur 2) (distribué par BD Biosciences Clontech)) ;

3- dans GLOMYC3-1 comportant un tag MYC du côté N-terminal (vecteur 3) , vecteur dérivé du vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen), dans lequel ont été insérées une région 5' non-traduite (5' UTR) et un tag MYC aux sites *HindIII-BamHI*, et la région 3'UTR de la globine (fragment *SpeI-XbaI* dans le site *XbaI*).

L'ADNc hASAP est amplifié à partir de son vecteur de clonage initial (pCR4-TOPO) par PCR en utilisant la polymérase haute-fidélité pfu Turbo, à l'aide d'amorces amplifiant l'ADNc entre la méthionine de départ et le dernier acide aminé. Les produits amplifiés obtenus sont sous-clonés dans les 3 vecteurs.

- Clonage dans PEAK-GFP. Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 58°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces  
hFIS-Exp1F (5'-GCCACCATGTCTGATGAAGTTTTAGCAC-3) (SEQ ID NO: 37) et  
hFIS-Exp1R (5'-GAAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 38).

Le vecteur est coupé par *EcoRV* et déphosphorylé : 10 ng de vecteur sont utilisés pour la ligation avec l'insert d'ADN. Le produit PCR est phosphorylé puis purifié sur high PURE PCR kit (Roche) : 100 ng d'insert sont utilisés pour la ligation [12h à 16°C dans 10 µl final (ligase Biolabs), suivant les conditions standards (Sambrook and Russell)].

- Clonage dans Glomyc : Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 60°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces :

Glomyc-FIS1F : (5'-TAATGTCTGATGAAGTTTTAGCAC-3') (SEQ ID NO: 39) et

Glomyc-FIS1R : (5'-TCAAAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 40).

Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le clonage dans PEAK-GFP.

- 5                   - Clonage dans YFP : Préparation de l'insert d'ADN : mêmes conditions que pour Glomyc, à l'aide des amorces :  
YFP-FIS1F (5'-AATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 41) et  
Glomyc-FIS1R (SEQ ID NO: 40) (cf ci-dessus).

- 10                   Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le  
clonage dans PEAK-GFP, le vecteur ayant préalablement été coupé par  
*Sma*1.

Les recombinants sont analysés par PCR en utilisant une amorce du vecteur et une amorce interne.

- 15                   PEAK-GFP : annealing à 58°C, extension 45 sec. à 72°C. et conditions  
standards pour le reste. Amorces : constFIS-2F (SEQ ID NO: 33) et GFP-1R  
(5'-TCAGCTTGCCGTAGGTGGC-3') (SEQ ID NO: 42).

YFP : annealing 55°C pendant 1 min. ; Amorces : YFP-2F (5'-ATGGTCCTGCTGGAGTTCG-3') (SEQ ID NO: 43) et hFIS-Exp1R (SEQ ID NO: 38) .

- 20                   Glomyc : annealing 44°C, extension 45 sec. à 72°C. Amorces : constFIS-2F  
(SEQ ID NO: 33) et SP6. Les recombinants sont séquencés par séquençage  
automatique à façon à partir des produits PCR (Genome Express, Meylan).

b) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression procaryote

- 25                   En utilisant une stratégie similaire à celle utilisée au para-  
graphe a) ci-dessus, l'ADNc hASAP a été cloné dans le vecteur pGEX-4T2  
(AMERSHAM), de façon à produire une protéine de fusion avec la GST,  
purifiable selon les protocoles standards.

c) Sous-clonage de l'ADNc mASAP dans un vecteur d'expression procaryote  
ou eucaryote.

- 30                   En utilisant une stratégie similaire à celle utilisée au para-  
graphe a) ci-dessus, l'ADNc mASAP a été cloné dans les vecteurs suivants :

- pGEX-4T2, (AMERSHAM), de façon à produire une protéine de fusion avec la GST, purifiable selon les protocoles standards.

- pEYFP-C1 de façon à produire une protéine de fusion (fusion N-terminale) avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) détectable par immunofluorescence directe.

d) Transfection, immunofluorescence et microscopie

d.1) matériels et méthodes

Les vecteurs obtenus sont transfectés selon la technique au phosphate de calcium ou de façon plus routinière en utilisant le procédé jetPEI (GDSP10101, Qbiogene) suivant les recommandations du fabricant, dans les lignées cellulaires suivantes :

- PEAK (ref. 37937, Edge Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France), uniquement pour les constructions ASAP humaines,

- HEK-293 (ATCC (American Tissue Culture Collection) référence CRL-1573 ; p53 -/- non synchronisable), pour les constructions ASAP humaines et murines,

- NIH3T3 non-transformées (constructions ASAP murines), et

- U-2 OS (ATCC HTB-96 ; p53 +/-, synchronisable)

Pour les vecteurs 1) et 2) (constructions ASAP humaines et murines), les localisations se font directement par détection de la fluorescence de la GFP ou de l'YFP à 24h, 48h et 72h après fixation des cellules au paraformaldéhyde et coloration des noyaux soit au propoiodure de propidium, soit au Hoechst 33286.

Pour le vecteur 3) la détection du tag MYC est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-MYC distribué par TEBU (9 E10, cat.#SC-40, Santa Cruz Biotechnology, CA) et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris marqué au fluorochrome Alexa-594 (Molecular Probes, ref. A-11032, distribué en France par Interchim, Montluçon), après la fixation des cellules et leur perméabilisation au Triton X100 0,1%. Les lames sont analysées, et les images collectées sur un microscope Zeiss Axiophot.

d.2) Résultats : Localisation cellulaire et colocalisation de la protéine ASAP avec l'alpha-tubuline

- localisation cellulaire

La Figure 4 illustre la localisation cellulaire de la protéine hASAP surexprimée dans la lignée HEK-293 (IP = Iodure de propidium).

L'observation au microscope à fluorescence des lames correspondant aux différentes transfections par les vecteurs 1), 2) et 3) montrent les mêmes types de profil : la localisation des protéines hASAP et mASAP est cytoplasmique et son profil fibreux rappelle celui des filaments de tubuline.

Par ailleurs, il semble que les cellules transfectées présentent des défauts de division car les noyaux sont toujours plus gros que dans les cellules non transfectées (Figure 4A et 4B). De plus, certaines des cellules transfectées semblent plurinucléées (Figure 4B). Ceci suggère une division anormale des cellules transfectées.

Enfin, la mitose des cellules transfectées semble anormale, tant au niveau de l'organisation des chromosomes, que du profil de localisation des protéines hASAP et mASAP au niveau du fuseau mitotique. Le profil de localisation des protéines hASAP et mASAP, en étoile, est caractéristique de la nucléation des microtubules en aster autour du centrosome (Figures 4C et 4D).

Un profil similaire de localisation de la protéine ASAP est détecté dans la lignée U-2 OS (p53 +/-) surexprimant hASAP et dans la lignée NIH 3T3 non-transformée surexprimant mASAP ; une accumulation de cellules monopolaires en mitose est observée.

En outre, en synchronisant les cellules U-2 OS et en récupérant les extraits cellulaires à différents moments du cycle, il a été vérifié que la protéine ASAP était bien présente dans toutes les phases du cycle cellulaire (interphase, S, G2/M).

- colocalisation de la protéine ASAP avec l'alpha-tubuline

La Figure 5 illustre la co-localisation de la protéine ASAP humaine avec l'alpha-tubuline ; de même la protéine ASAP murine co-localise

avec l'alpha-tubuline.

La Figure 5 A illustre la localisation cellulaire de l'alpha-tubuline détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-tubuline (Alexa-594, Molecular Probe).

5 La Figure 5 B illustre la localisation de la protéine ASAP marquée à la YFP (yellow fluorescent protein).

La Figure 5 C représente la superposition des 2 images démontrant la colocalisation des 2 protéines.

**EXEMPLE 5 : Production d'anticorps polyclonaux anti-hASAP et mASAP**

10 a) Production d'anticorps

Les constructions suivantes de la protéine ASAP ont été clonées dans le vecteur d'expression procaryote pGEX 4T-2 (AMERSHAM) comme décrit à l'exemple 4 :

- protéine ASAP humaine entière (SEQ ID NO : 1)
- 15 - protéine humaine délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel (résidus 1 à 421, SEQ ID NO : 47)
- protéine murine entière (SEQ ID NO : 46).

Les protéines ont été exprimées dans *E. coli* et purifiées selon les protocoles standards. Des lapins ont ensuite été immunisés avec les protéines ASAP purifiées selon un protocole standard, et les sérums immuns ont été récoltés.

20 b) Analyse de la réactivité des sérums polyclonaux vis-à-vis de la protéine ASAP endogène.

Les sérums polyclonaux monospécifiques dirigés contre la protéine hASAP entière ou délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel, ont été testées en Western-blot et en immunofluorescence, sur des cellules HEK-293 et U-2 OS, selon des protocoles standards.

En Western-blot, le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP entière détecte une protéine d'un poids moléculaire apparent d'environ 110 kDa correspondant à la protéine ASAP endogène, aussi bien dans les cellules HEK-293 que les cellules U-2 OS. Dans ces conditions, un anticorps anti-FLAG, détecte une protéine de poids moléculaire

équivalent, dans des cellules contrôle HEK-293 ou U-2 OS, transfectées par un vecteur d'expression de la protéine hASAP fusionnée avec une étiquette FLAG.

5 En immunofluorescence, le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP entière marque les microtubules des cellules HEK-293 en interphase, les asters des cellules en mitose et les microtubules du corps résiduel en fin de télophase.

Le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel  
10 présente le même profil en immunofluorescence et détecte une protéine d'environ 110 kDa, en Western blot.

Le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine mASAP est utilisé pour détecter quels sont les types cellulaires exprimant ASAP et à quel(s) stade(s) du cycle cellulaire elle est exprimée, par immuno-  
15 fluorescence sur des coupes testiculaires de souris.

**EXEMPLE 6 : Analyse fonctionnelle de la protéine hASAP à l'aide de mutants délétés de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT ou de la région C-terminale contenant le domaine MAP potentiel.**

Des fragments d'ADNc codant pour une protéine hASAP  
20 délétée de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT (Ndel1 : résidus 304 -647 (SEQ ID NO : 48) ; Ndel2 : résidus 411-647 (SEQ ID NO : 49) ; Ndel3 : résidus 478-647 (SEQ ID NO : 50)) ou de la partie C-terminale contenant le domaine MAP (Cdel1 : résidus 1 à 477 (SEQ ID NO : 51) ; Cdel2 : résidus 1 à 418 (SEQ ID NO : 52) ; Cdel3 : résidus 1 à 303 (SEQ ID  
25 NO : 53)) ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces appropriées puis clonés dans les vecteurs d'expression pEAK10-EGFP (fusion C-terminale avec la GFP) et pEYFP-C1 (fusion N-terminale avec la YFP) selon un protocole similaire à celui décrit à l'exemple 4.

Les différentes constructions ont été transfectées dans les  
30 lignées HEK-293 et U-2 OS puis la localisation cellulaire des différents mutants de la protéine hASAP a été analysée comme décrit à l'exemple 4.



On constate que pour les mêmes délétions, un profil similaire est obtenu avec la construction comportant la YFP en N-terminal ou la GFP en C-terminal.

5 Par comparaison avec la protéine hASAP entière, les 3 constructions délétées de la partie C-terminale ne colocalisent plus en inter-phase avec la tubuline et ne présentent plus un aspect fibreux ; ces résultats indiquent que la délétion intéresse un domaine MAP. En outre, aucune cellule monopolaire bloquée en mitose n'est observée dans les cellules surexprimant les mutants délétés de la partie C-terminale contenant le domaine MAP.

10 Par comparaison avec la protéine hASAP entière, les 3 constructions délétées de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT, présentent une localisation nucléaire sous forme de foyers mais il reste dans le cytoplasme quelques fibres co-localisant avec la tubuline.

L'analyse fonctionnelle de la protéine hASAP est complétée  
15 par des expériences d'inactivation de l'expression du gène par des ARN interférents (ARNi).

## REVENDICATIONS

1°) Protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

5 a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, correspondant à la protéine ASAP humaine, et

b) une protéine présentant, sur la totalité de sa séquence, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou moins 95% de similarité, avec la protéine de séquence  
10 SEQ ID NO: 1.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 46 correspondant à la protéine ASAP murine.

3°) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment  
15 d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2.

4°) Peptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste de séquence en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 14 et SEQ ID NO: 47  
20 à 53.

5°) Protéine variante de la séquence SEQ ID NO: 1 ou de la séquence SEQ ID NO: 46, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation entraînant un dysfonctionnement de la protéine.

6°) Protéine ou peptide selon l'une quelconque des revendica-  
25 tions 1, 3, 4 ou 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide d'origine humaine.

7°) Polynucléotide isolé, répondant à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences codant pour une protéine ou pour un  
30 peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;

- les séquences représentées sous les numéros SEQ ID NO: 15 et SEQ ID NO: 45 dans la liste de séquences en annexe, correspondant respectivement aux ADNc ASAP humain et murin,
- le fragment d'ADN génomique de 29800 nucléotides  
 5 répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 16, correspondant au gène *asap* humain ;
- un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'une quelconque des séquences précédentes, à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et des EST  
 10 répertoriés sous numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134,  
 15 AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007,  
 20 BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509,  
 25 BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ;
- un fragment de l'un quelconque des séquences précédentes, sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste des  
 30 séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 16 à SEQ ID NO: 30 ;

- une séquence présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, après alignement optimal avec l'une des séquences ou l'un des fragments précédents ;

- les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

8°) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ ID NO: 15 ou 45.

9°) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une mutation conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondant à la séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID N : 46.

10°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou de l'une des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et d'un des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835,

AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou de leurs fragments, comme sonde pour détecter, identifier ou doser des polynucléotides correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, particulièrement dans d'autres organismes.

11°) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la sonde est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 15, 45 ou SEQ ID NO: 17 à SEQ ID NO: 44.

12°) Amorce pour l'amplification des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, particulièrement dans d'autres organismes caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 31 à 43.

13°) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification à l'aide des amorces selon la revendication 12.

14°) Méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13, ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11 préalablement marquée dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

15°) Méthode selon la revendication 14, dans laquelle la deuxième étape est une étape de transcription inverse et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 12 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

16°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du

taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

17°) Méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13, ou de mise en évidence des variants alléliques dudit gène ou de mise en évidence d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

18°) Méthode selon la revendication 17, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'amorces selon la revendications 12 et la troisième étape une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

19°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

20°) Trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 comprenant :

- au moins une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11 et/ou des amorces selon la revendication 12 ;
- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification ;
- les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

21°) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13.

22°) Cellules hôtes transformées, dans lesquelles au moins  
5 un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou au moins un vecteur selon la revendication 21 a été introduit.

23°) Organismes transgéniques non-humains, dont tout ou partie des cellules contient au moins un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 123 ou au moins un vecteur  
10 selon la revendication 20, sous une forme libre ou intégrée.

24°) Organismes transgéniques non-humains selon la revendication 23 caractérisés en ce qu'ils sont porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

25°) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 22 ou d'un organisme transgénique non-humain selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, pour la production d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

26°) Méthode de préparation d'une protéine ou d'un peptide  
20 selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la revendication 22 ou un organisme transgénique selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

27°) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de préparation selon la revendication 26.

28°) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

29°) Anticorps selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il reconnaît, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

30°) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

5 31°) Méthode de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, dans les cellules d'un échantillon biologique, comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,
- 10 - une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 et
- une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

15 32°) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 pour la détection et/ou la sélection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

20 33°) Méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité de cellules cancéreuses comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,
- 25 - une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29,
- une troisième étape de mise en évidence et de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et
- 30 - une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi.



34°) Trousse permettant de mettre en oeuvre la méthode selon l'une quelconque des revendications 31 ou 33 comprenant :

- au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ;
- 5       - les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

35°) Méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou la protéine ou un peptide selon  
10 l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine et
- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la  
15 protéine.

36°) Méthode de criblage d'une substance capable de moduler l'activité de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un  
20 échantillon biologique exprimant la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, avec une substance à tester,
- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine, et
- dans une troisième étape on sélectionne des substances  
25 capables de moduler ladite activité.

37°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27 ou polynucléotide ou fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou vecteur selon la revendication 21 ou cellule transformée selon la  
30 revendication 22, utilisé comme médicaments.

38°) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27 ou d'un polynucléotide ou d'un fragment selon

l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou d'un vecteur selon la revendication 21 ou d'une cellule transformée selon la revendication 22, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

- 5                   39°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment anti-sens selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou d'un vecteur contenant un oligonucléotide anti-sens selon la revendication 21 et capable d'inhiber l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à
- 10 9 ou de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 5, 6 dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives, liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

1/5

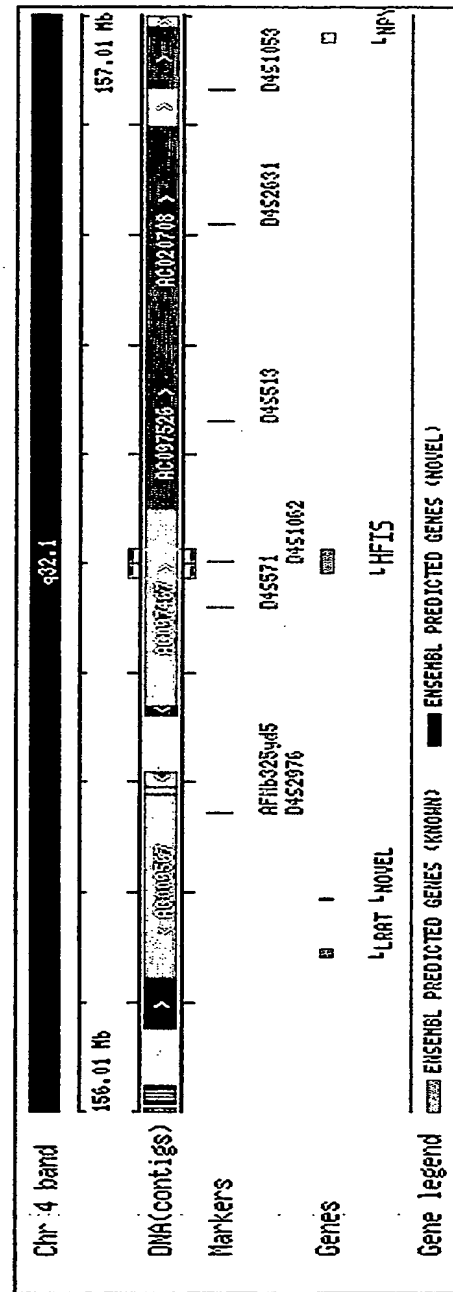
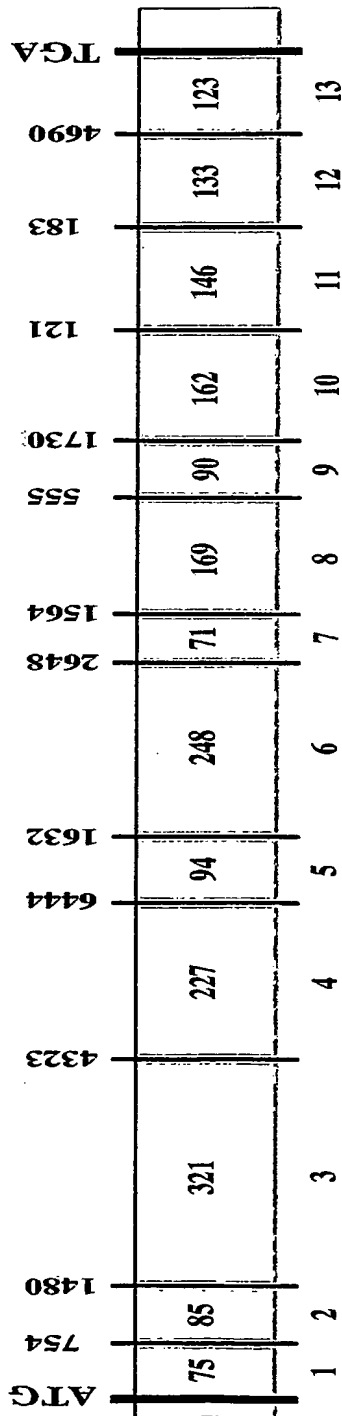
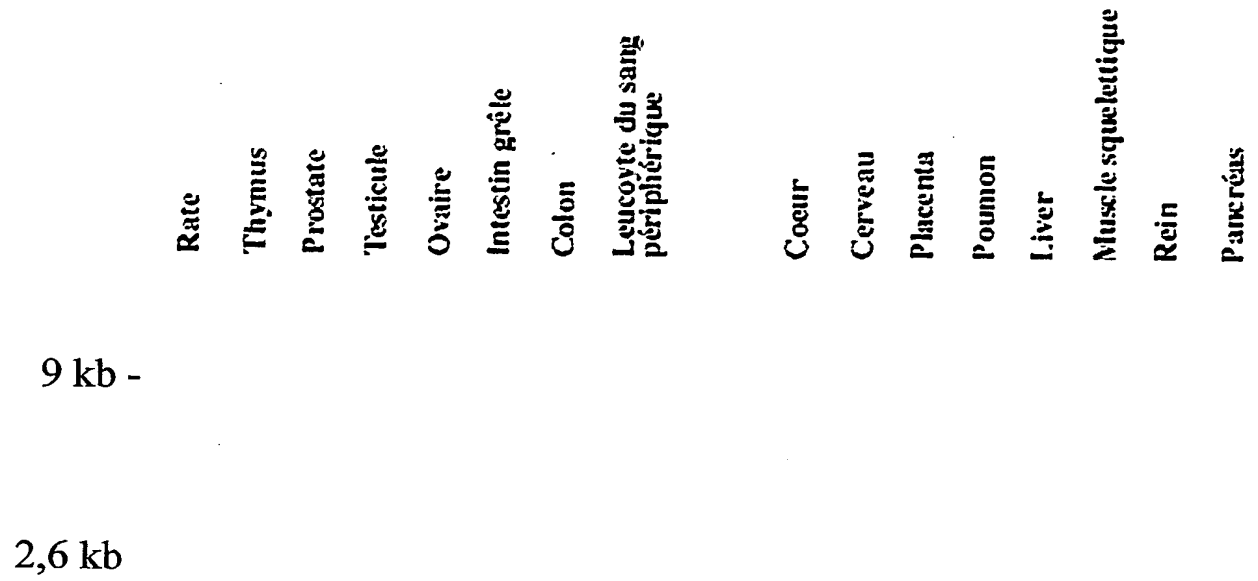


Figure 1

JCS9 Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2005.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/5

**Figure 2**

JCO9 Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2009

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/5

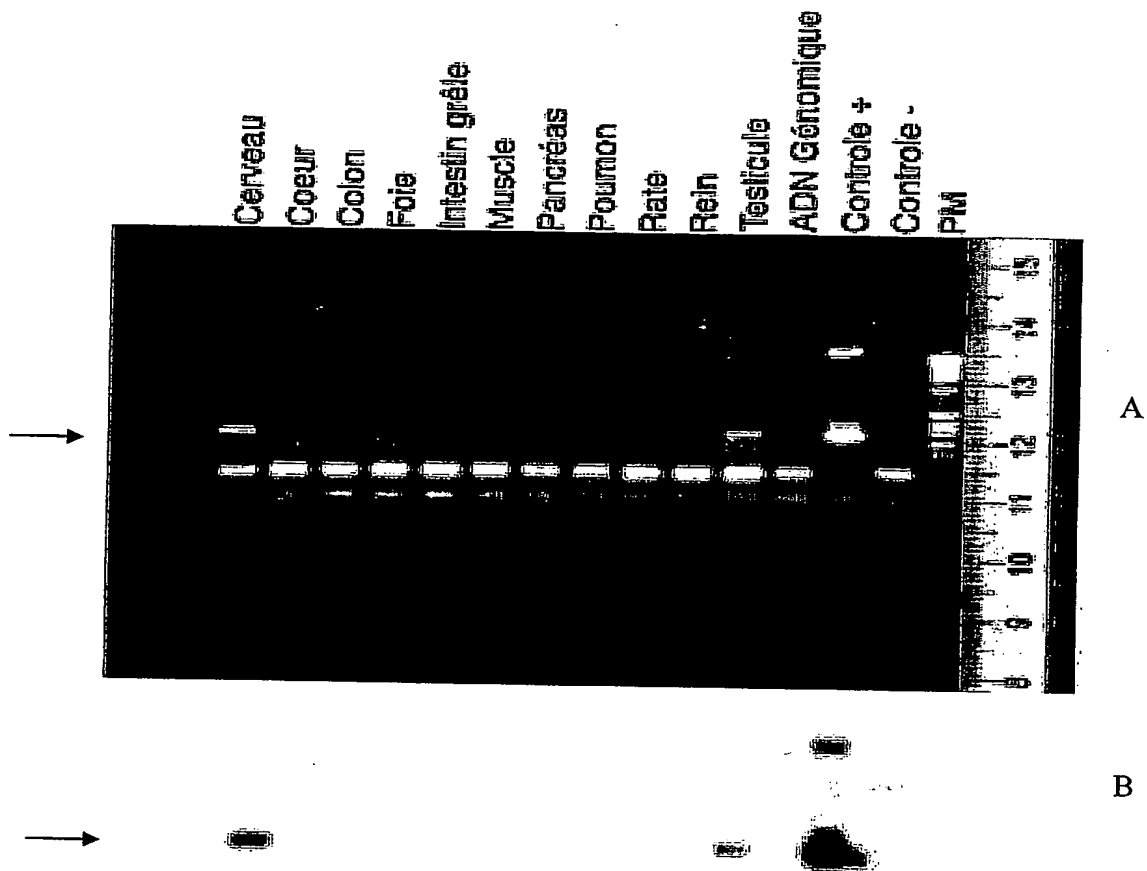


Figure 3

JC09 Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2005,

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4/5

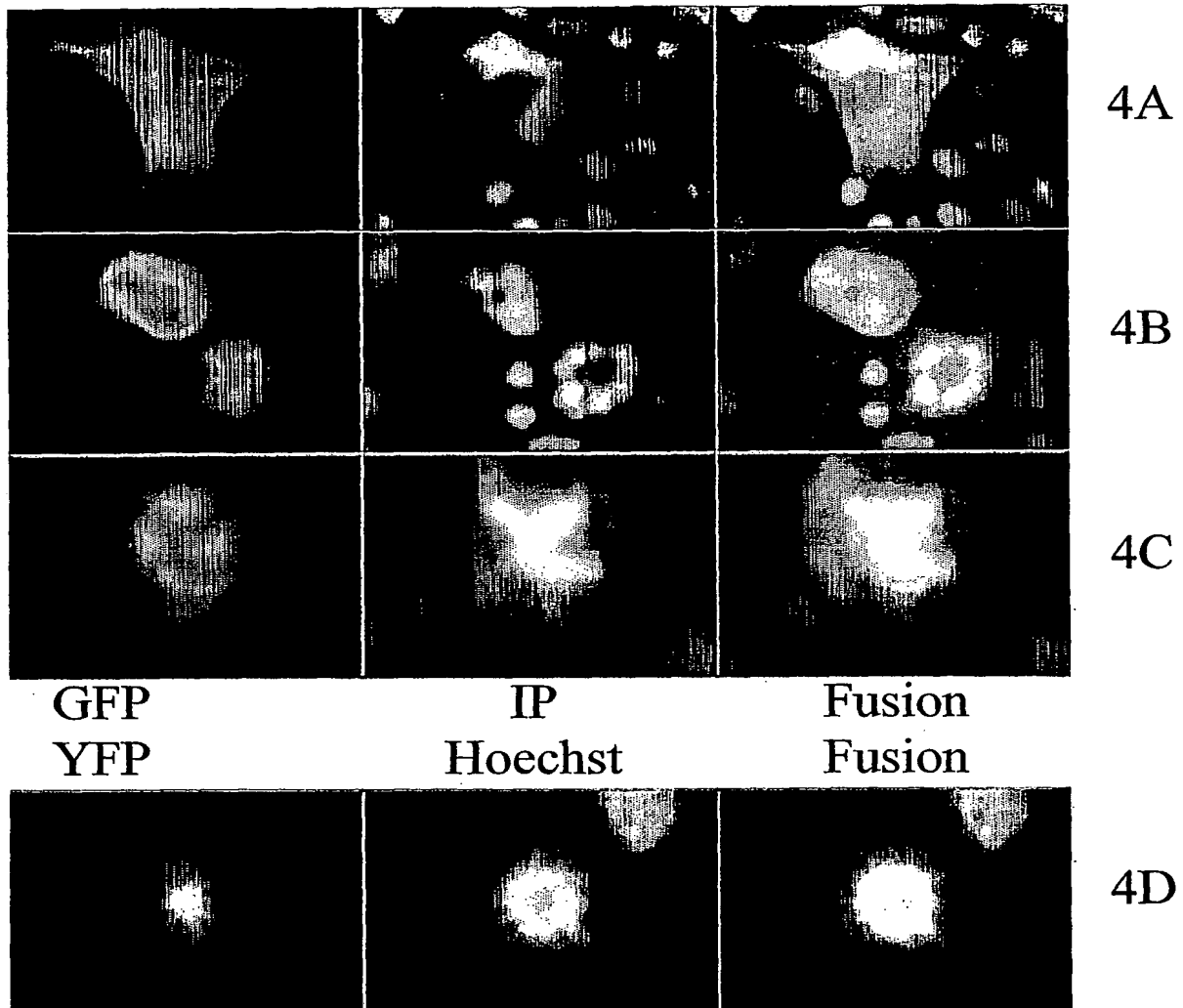


Figure 4

JC09 Rec'd PCT/PTO 24 JUN 2005,

**THIS PAGE BLANK** (USPTO,

5/5



A

B

C

**Figure 5**

**THIS PAGE BLANK (continued)**

s644PCT88.ST25  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

GIORGI, Dominique

SAFFIN, Jean-Michel

ROUQUIER, Sylvie

&lt;120&gt; Nouvelle protéine associée aux centrosomes et ses applications

&lt;130&gt; s644PCT88

&lt;160&gt; 53

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 647

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
1 5 10 15Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
20 25 30Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
35 40 45Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
50 55 60Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
65 70 75 80Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
85 90 95Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
100 105 110

s644PCT88.ST25

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
 115 120 125  
 Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
 130 135 140  
 Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
 165 170 175  
 Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
 180 185 190  
 Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
 195 200 205  
 Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
 210 215 220  
 Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
 225 230 235 240  
 Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
 245 250 255  
 Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
 260 265 270  
 Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
 275 280 285  
 Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu  
 290 295 300  
 Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser  
 325 330 335  
 Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr  
 340 345 350  
 Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala  
 355 360 365  
 Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser  
 370 375 380

## s644PCT88.ST25

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400  
 Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile  
 405 410 415  
 Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430  
 Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445  
 Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
 450 455 460  
 Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys  
 465 470 475 480  
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys  
 485 490 495  
 Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu Ala  
 500 505 510  
 Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys  
 515 520 525  
 Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys  
 530 535 540  
 Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val  
 545 550 555 560  
 Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys  
 565 570 575  
 Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys  
 580 585 590  
 Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu  
 595 600 605  
 Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His  
 610 615 620  
 Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg  
 625 630 635 640  
 Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 645

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln  
 20 25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser  
 1 5 10 15

Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile  
 20 25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala Asp Glu Asn Ser Val  
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn  
 20 25 30

Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys Ser Asn Gly Asn Ile  
 35 40 45

Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn Glu Glu Glu Met Ala  
 50 55 60



s644PCT88.ST25

Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser Phe Ser Glu Ser Gln  
 65 70 75 80

Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile Lys Met Lys Pro Lys  
 85 90 95

Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
 100 105

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 76

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
 1 5 10 15

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
 20 25 30

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
 35 40 45

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
 50 55 60

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu  
 65 70 75

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Asp Ser Cys Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu  
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Phe Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys  
 20 25 30

&lt;210&gt; 7

s644PCT88.ST25

&lt;211&gt; 83

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Asp Pro Asn Glu Glu Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp  
 1 5 10 15

Glu Asn Lys Glu Asn Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val  
 20 25 30

Glu Lys Ser Lys Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu  
 35 40 45

Lys Ala Lys Ala Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro  
 50 55 60

Leu Leu Ser Lys Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala  
 65 70 75 80

Ser Ser Lys

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Lys Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn  
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg  
 20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr  
 1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu  
                   20                  25                  30

Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp  
           35                  40                  45

Asn Ile Arg Ala Ala Val  
       50

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His  
   1                  5                  10                  15

Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln  
           20                  25                  30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp  
   1                  5                  10                  15

Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg  
           20                  25                  30

Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg  
       35                  40                  45

Lys Gly Glu Ala Leu Gln  
       50

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; PRT

s644PCT88.ST25

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys  
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu  
 20 25 30

Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys  
 35 40 45

Trp

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile  
 1 5 10 15

Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys  
 20 25 30

Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp  
 35 40

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys  
 1 5 10 15

Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro  
 20 25 30

Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 35 40

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 2575

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

```

acttccttcg tctgggtggt tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta      60
cccgagagac ccggcggtgg ggaagtcact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc      120
gccctccgcc tctgttatta gccctcctc ctcgctcggt ccaggaccgg ctctgcgggc      180
gccgccaggc ccagaccaag ctactatcag aagttgaatt ctaataatta gctattttat      240
aaaggtaacg agaaaaaata cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat      300
acaaagagtc caaaagttac caaaagaact actttccagg atgagctaata aagagcaatt      360
acagctcgct cagccagaca aaggagttct gaatactcag atgactttga cagtgatgag      420
attgtttctt taggtgattt ttctgacact tcagcagatg aaaattcagt taataaaaaa      480
atgaatgact ttcatatatc agatgatgaa gaaaagaatc cttcaaaact attgtttttg      540
aaaaccaata aatcaaacgg taacataacc aaagatgagc cagtgtgtgc catcaaaaat      600
gaagaggaaa tggcacctga tgggtgtgaa gacattgttg taaaatcttt ctctgaatct      660
caaaataagg atgaggaatt tgaaaaagac aaaataaaaa tgaaacctaa acccagaatt      720
ctttcaatta aaagcacatc ttcagcagaa aacaacagcc ttgacacaga tgatcacttt      780
aaaccatcac cttggccaag gagtatgtta aaaaagaaaa gtcacatgga ggagaaggat      840
ggactagaag ataaagaaac tgccctcagt gaagaattgg agttacattc tgcaccttct      900
tcccttccaa cgccgaatgg catacaatta gaagctgaga aaaaagcatt ctctgaaaac      960
cttgatcctg aggattcatg cttacaagt ctagcatcat catcacttaa acaaattctt     1020
ggagattctt tttcaccagg atctgaggga aacgcatctg gaaaagatcc aaatgaagaa     1080
atcactgaaa accataattc cttgaaatca gatgaaaata aagagaattc attttcagca     1140
gaccatgtga ctactgcagt tgagaaatcc aaggaaagtc aagtgactgc tgatgacctt     1200
gaagaagaaa aggcaaaagc ggaactgatt atggatgatg acagaacagt tgatccacta     1260
ctatctaaat ctcagagtat cttaatatct accagtgcaa cagcatcttc aaagaaaaca     1320
attgaagata gaaatataaa gaataaaaag tcaacaaata atagagcatc cagtgcattc     1380
gccagattaa tgacctctga gtttttgaag aaatctagtt ctaaaaggag aactccatcg     1440
acaactacct cttctcacta tttagggaact ttaaaagtct tggacaaaa accttcacag     1500
aaacagagca tagaacctga tagagcagat aacataaggg cagctgttta tcaggagtgg     1560
ttagaaaaga aaaatgtata tttacatgaa atgcacagaa taaaaagaat tgaaagtgaa     1620
aacttaagga tccaaaatga acagaaaaaa gctgctaataa gagaagaagc attagcatca     1680

```

## s644PCT88.ST25

ttgaggcct ggaaggctat gaaagaaaag gaagcaaaga aaatagctgc caaaaagagg 1740  
 cttgaagaaa aaaacaagaa gaaaactgaa gaagaaaatg ctgcaagaaa aggagaagca 1800  
 ctacaagctt ttgaaaaatg gaaagagaaa aagatggaat atcttaaaga gaaaaataga 1860  
 aaggagagag aatatgaaag agcaaagaaa cagaaagagg aggaaactgt tgccgagaaa 1920  
 aagaaagata atttaactgc tgttgagaaa tggaatgaaa aaaaggaagc ttttttcaag 1980  
 caaaagaaaa aagaaaaaat aaatgagaaa agaaaggaag aactgaaaag agctgagaaa 2040  
 aaagataaag ataaacaagc tattaatgaa tatgaaaaat ggctggaaaa taaggaaaaa 2100  
 caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgctattcct ttcttgaaag tgaggcactt 2160  
 cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttcgcaaaaag tgttttgata attctagttc 2220  
 ttacattatt tggttattta tcggtttgcc aatattagcc atagatttaa accattcaat 2280  
 tatttatagt tagaggaata tattttaatt aaatgccaga cactcctgct gacaatgaaa 2340  
 gaaatacttt ggaatgtaat cagtgaagc atttttttga actgtagata aactgcctca 2400  
 aacaaagacc taataatcag attgttttta ccattaagat acataagatt ttatcatgtc 2460  
 ctgataattc ttatggtgga gtgattcatg atctttttca ttaagctctg tatgttattt 2520  
 aagtatattt aattccagta ataaaaagga aatcatctag gtaccataaa aaaaa 2575

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 29750

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 16  
 tctgggtggg agttgggagg gtcctgtctc ctaggcaaca gcacatgcac acaagcgacc 60  
 aataatgagc ccctctccaa agaccagga aggtgatgtc acttccttcg tctgggtggg 120  
 tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta cccgagagac ccggcgggtg 180  
 ggaagtcact tcctcccgaa gacgtgttt cctagcaacc gccctccgcc tctgttatta 240  
 gccctcctc ctgctcggg ccaggaccgg ctctgcgggc gccgccaggc ccagaccaag 300  
 gtgagcagct cctaccgat gcttggctct tgattctcag ggtcgcggag aactggccgc 360  
 gggcgtccgg ggccgggaac agaaagcggg acctgggggc catgggggat ccggacagag 420  
 accgcgcttg gacgtgcagc ggcctggcgt tcgctggtgc tcagcatacg gcgcggtgag 480  
 gagcggcgag caccgggacg tcacctggcc tggtagggaa cggaaccggg ggcgcacaac 540  
 gctatgggag gccctgccag gcctctgctc cgagtacggg aaaccgcgat tttaatgcgg 600  
 ctcatcgca aagcttcgtc gttttgtctg gctctcttta acacttttgt gagaggaaaa 660  
 attggcttgc aatacatctc gctggctgtt tgcgggttag cattacgatc tttttctttg 720  
 aatagcgctg tatgcaaata tatagataca tttttttttt ggtgggtggg ctcataattt 780

## s644PCT88.ST25

ttacgccgac gatccttttg atggcctttt aaataagacg tgacttattt tgaaggcaat	840
gttatacttt agaagagagg tgaaaaataa ggtgttctat ttttaattggc agcattttgt	900
cgtattaact tgtaatcatt tatttgcaga ctttttaagt agttgcaaaa ctatttttagg	960
ataacttcca tttgaatttt tttaaacaag cttgttatga gaatttgcta tttctttaca	1020
agaacctttt taagtgaaga tgtagcccaa tgttcatatc agatgctttt ctttgacctt	1080
tgtggggaga gtagaatcaa atgtaataaa ataaattctg aagcatgcga agtctgattt	1140
gttttgtata tttcagctac tatcagaagt tgaattctaa taattagcta ttttataaag	1200
gtaacgagaa aaaatacact atgtctgatg aagtttttag caccactttg gcatatacaa	1260
agagtccaaa agttaccaa agaactactt tccaggtaaa gtatttttat ttggaatcat	1320
ttcacagtgt aaacactgta ttagatgggt tgaaattgggt gattctagaa cagtcctata	1380
taaagcaggg gtaaactctta tattactttt gaggttttgc acatgatcat gtttgggctc	1440
catccagtat tacaaactcc cctatatggt ttttaagacta ccaaagtagc ctcaatacta	1500
gtttcctact aagttaaaag ttgaatcgca accttaaatt gccattttta tataaaaact	1560
tttttttctg ttgtaacata atgtttaagt ttttttttct gttgagtcac tgcaattttg	1620
aactcagcct ctaagtttgc aatattgatt gcatccattt ctgaaatatg ccgagacaaa	1680
agctcttaaa aataccaatt tctttcaaaa taccagtttt taataaatta taatctaaat	1740
tgagccccctt cttatttggt accctccagc tctaattata acctgcaatt aatttgttcc	1800
ataatgtgtg tctcctctag ttaaactgcg agctccatga ggaagggtc ttgtctgtga	1860
tgctctgcat tgagtatgag gcgtaaagtg ggtacatggc ataaagtgag cttgcaggaa	1920
atatttgta gatgaatgaa acctaaagttt gaaagcagtc gttaatcaag cattgtttgt	1980
ttaaagaatt acttgatgaat atgatacctc catgtttgga tggaaattga tttcagtatc	2040
tcatttcagg atgagcta atagagcaatt acagctcgct cagccagaca aaggagttct	2100
gaatactcag atgactttga cagtgatgag attggtatgt gacagtatgg aaacgtgaac	2160
cacttttctt ctttttgctt ccttagtttt gtatttagcc agcccccaa ccacccatcc	2220
cctcaatcac gtatgttaaa ataataccta agcattcact aattttagat tttcaacttt	2280
ttaattagta gaaagccact ctttaattttc aggaagttgt atgattttct ttttttattg	2340
ttgttttggt ttctgaatgt gtatacgaaa atataaatta attgatggca ggtttgcagt	2400
aaaaggatgg ctgccagtgg taaaccacat tgaagaagac aggttcatct ttaagatcaa	2460
ccctaggagg tgctacagct agttagtaac tagtcccaca gaactaaact tcggtgcaca	2520
ttagaagtgc ttttataaag cttgctataa atcagatttt ttttggtgtg gataaggggt	2580
aaatttaaaa accacagact cttcgtgttt catatatcag tactattata atttggtttc	2640
tcttagctat gtaaacatat taacatttta gtttcaggta taagcataca gaattctaaa	2700
cttgggtgtt ttgtttgttt gttttgttt ttgagatgga gtctcgctca gttgctcaag	2760
ctggagtgc gtggtgcaat ctcggctcac tgcaacctcc acctcccagg ttcaagtgat	2820

## s644PCT88.ST25

tctcctcctt	cagcctcctg	agtagctggg	actacaggtg	cccgccacca	tgcccggcta	2880
atTTTTgtat	TTTTagtaga	gatgggggtt	caccacatcg	gccaggctgg	tctcgaactc	2940
ctgaccttgt	gatccgcccc	cctcagcctc	ccaaagtgct	gggattatag	gtgtgagcca	3000
ccgcacccgg	cctgggtgtt	tattctttaa	aatttggtga	ataattgtaa	ttgatttctg	3060
taaaaccagt	aataaccaca	gttaaatac	tgctgtatag	ttaaacttagc	atttcttatg	3120
attcttagta	aatctaatat	tctgggtgtg	atggaattgt	agttccaaaa	tttttatgga	3180
aaaaatataa	ttagtaatta	ctaattaaat	tcttccattt	acaaatgttc	ttgattttac	3240
atgaagaagt	aatttgcaaa	taaaagttt	acagtccata	atctaattta	aatgctacat	3300
gactgattgt	tagggacctt	tggatggctt	ttccagagc	aaacagtgtt	tggttgtttg	3360
gtaccctaca	gacaacacaa	taaatacatt	ttgaataaat	taatgaaatt	ggaattttta	3420
tttcataaat	gttaatgaga	cgtgcctgag	ttagctgtgt	ttttagagct	gcaagtctat	3480
ttataaaata	catttggtgcc	tattcattgt	tagaattttg	tttgtagctt	ttaaggtaaa	3540
ctttgattaa	gttaacgtaa	ccttgacaat	ttttaaaaaat	actgttgaaa	acatttttct	3600
tttccatttt	tcagtttctt	taggtgattt	ttctgacact	tcagcagatg	aaaattcagt	3660
taataaaaaa	atgaatgact	ttcatatatc	agatgatgaa	gaaaagaatc	cttcaaaact	3720
attgtttttg	aaaaccaata	aatcaaacgg	taacataacc	aaagatgagc	cagtgtgtgc	3780
catcaaaaat	gaagaggaaa	tggcacctga	tgggtgtgaa	gacattgttg	taaaatcttt	3840
ctctgaatct	caaaataagg	atgaggaatt	tgaaaaagac	aaaataaaaa	tgaaacctaa	3900
accagaatt	ctttcaatta	aaagcacatc	ttcaggtaat	ttgttaggat	tactgttaatt	3960
gcatttcttg	gaagtttatt	ttaagataat	cagtcccaaa	atttttatat	ggtagctagt	4020
atatatttaa	gaaaaaaaga	cagacttaac	ttccatttta	cagacctgtt	gtattttgtc	4080
taacttcaat	tttacagacc	tgttgtattt	tgtctaactt	caattttaca	gacctgttgt	4140
atTTTgtctt	gcatctaggc	tgttgcctga	tagaaagcca	aagcacaaag	caaagcacc	4200
tttagtcatc	catagcatcc	atagctgtgg	atctccagac	acctagacct	gtgagcttca	4260
gttttgtttg	taggtgtgga	actggaatgg	aatgctgtct	aatccctctc	acactccaaa	4320
gattagagtt	acagcaatat	tgagactaat	ccttctaaca	gtctttgcca	taccaacatt	4380
gtgccagaaa	atTTTcttga	catttgtata	tttgaaggat	gagttatgtt	attgctgctg	4440
ttgtttgttg	aagcatccag	gcactcctta	agagaatctc	catttgatct	ctgtattgcc	4500
tatgaaaatc	tactaagatt	cagttttcca	aaggaaagtt	cctgggtgtga	tctgggatta	4560
cagttagttc	tgcccacaat	tttactgaat	tttaagcata	aaggaaacaaa	gatagaatga	4620
aacggagacc	aagtcctgtc	acataccctg	ggccaccatt	catgaacttg	tatatgcaag	4680
gttaaggatt	ttttgttttt	catttcttgt	atTTTataaa	ggaattatta	gttgatgtta	4740
accttcataa	aatctcctt	gcatatcatc	agtaaataca	gtgctggtaa	atatttcata	4800
ctttgcatat	tagataccag	tggtaacgtc	agacaaaact	ttatttcagg	catgtattgg	4860



## S644PCT88.ST25

ggaactgctc ctttcttcct gacccacaaa ttcattaac tttgaaatga gcaaaggatg 4920  
 taagcagagc aaagaacact agaataatat ccaggacact gggggaaagg cctctgtata 4980  
 ttatatatga cttcagcaaa taagttaagc ttcagtatcc tcatgatgag gaagctaaaa 5040  
 ataaccctct ttctattcct gcaaaattgt gagagtttat tgaagtgcac ctcataaact 5100  
 ataaaaaact acaaaaatgc aaacagatgc ataataaac aattaacttg ttaaaatgta 5160  
 ccttctaagt atagtgaagt aaatcaatgc tggagagaag aggaacataa ttgaacttcg 5220  
 ttattaagaa aatgcgagca tatatagcaa ctaaaaattt gtctgagaca ggtggatgta 5280  
 tataattaga agtttatggt agataatcag gaaagcaata atccacctat ttcataacct 5340  
 aaaaaaaaaa aaaacctgtg gtgggttaca atgaataaga aaatactgta ttttaaccac 5400  
 aaggtggcat caggatccta aatgctctac ttatatatgc aatgttatat tcagtacgtg 5460  
 taatataaaa ataattacct aaataggtaa ttgtatacat tgattaccaaa aaaaagcgct 5520  
 tttcttaaaag tataggcatt ttttttctt tttgggaact tgacagtact tctggaagtg 5580  
 gaatttttgt agaaaatata ttaaagttgt cattctcagg ttcttcagggt tgaagagtaa 5640  
 aaattgaggc tagtgctcct aagataatat ctggcatata taataagtat ttaaatgaat 5700  
 aaattaatat atgaatgatt tatctttgaa agaggggaata tggttcatga gtttatcctc 5760  
 taaattcttt gacttttttt ttttctgtac aggtttggaa ctcaatgttt ttaatgtggt 5820  
 gagatattgc tgagtagcaa gtaatgcttt atgaaactat tagagcttga aggttttctc 5880  
 tgtccttgct tgtcttttgt aaaaagtata ataaccagac tttatagtca ctactgaagt 5940  
 gacagttgct ctataaagtg aaagtatttt tcacaggata tgtttttatt ttaataactaa 6000  
 catgactgaa atcatgaact ttggagtcag gatgcttctc ctttaatctg agatctgcag 6060  
 cctgctagag tttgtgactt tgggcatgag acctctttgt tctcatttta ttcattctta 6120  
 aaaacgggat aatagttgcc tgcctctagg agtttgaggc aattaaatga gttcacatat 6180  
 ttgaagtgct tagaatagta ctggcataaa tttagcactc tataaatgtt ctgattattc 6240  
 attttattat ttagcgtttg tttataaaca tgctcagcag gtataaagta tcagtcatgc 6300  
 gggatgctga agttctagag atctgctgta cattgtgcct atagttaaca gtactgtctt 6360  
 ttgactgaa tgtattaaga aggtagatct catgtttgtt cttaccacaa taataaaaaa 6420  
 aattgactca acaccttctt tcaggcatta tataatatc tgcttaaact gaggtcaaaa 6480  
 agacatgcaa gcatttgta ggaggagaag cagggaagtgg atattctagg cagggggatc 6540  
 agcttaggta aaggtatggt agcaggaggg attggagggg ttgtggtatg tgtgcatgac 6600  
 aactgttagc ccagcatttc agaaacacag atgacaaaat ggctgtagat aaggcagtga 6660  
 aggacaaaac cataaaatcc gttttatggt gtttaaaggc agttaagctt ttattctgta 6720  
 ggattggatc atggggagcc attgaataat tttgtagaaa ggagtgatgt gatctgattt 6780  
 ggattttgta aatatcatgg aagcagtgat ctaggaaaga gtggataagg acccgacagc 6840  
 agggatgtag aaagtggaat aaatgagata tttggcaatt agaattgata ggatatattg 6900

s644PCT88.ST25

atactctgga tttaggggat aatagagggg ggaatctaga gcccttggat ttgggggttga	6960
acatttggct ggagtttagg atgtagctaa aattgtcagc tacttataat aataccaatt	7020
tggtatggtt gtggaatctt ctggcagaat ccataagccc attttttaggt aaatgggagg	7080
aagatgttaa ttagaccaat tttgaagttg agaaaaatgc atttgtagaa caatagaaac	7140
ataaatatgt atagcaggta aaatgcaggc aaaaaatata tacatggaaa gtcttcccat	7200
tgtttcgaat actggatgca aatcagcatt tgattcttga tttaaactta gaagtaatgg	7260
aaagagtga attttaataa atgctaaaga agttttatgg actcagaaca attaactcat	7320
aaaagattcc ttcctcta at gagagttagc actcctatcc cttgagtgcc aacatcatca	7380
tctttgtcct tataatagca cttataatct tagtaatcta gtcttgtaat tttgtttaga	7440
aaaatcaacc tgtaaagtac ctggacaggc ccattgccgc tttgttgatt atgaggttta	7500
gtaacgtgta cagggcttgg tactcaaagg cttgatggat gagcctcctc attttatagt	7560
ggtagaaact ggggcaagat tttgttttgt ttttttat ttaacatttt ttttttaata	7620
ttataagagt tcacaatgtt gaagagttaa cttcttgtga ctggttactt tcaggatgac	7680
aactgtttct ttactttgtt ttttttttgt tgttgttgtt gtttggtttt ttttttttt	7740
ttagatggat ttttgcctt attaccagc ctggagtgc gtggtgtgat ctcgatctcg	7800
gctcactgca acctcagact cctgggttca agcaatcctc ctgcctcagt ctcctgagta	7860
gctgggatta caggcacgcg ctactaagcc cggctaattt ttttgtattt ttagtagaga	7920
cagggtttca ccgtgttagc caggctggc tcgaactcct gacctcatga tctgcccacc	7980
tcggcctccc aacgtgctgg gattacaggc gtgagtcacc gctcccaaca tgcgggatc	8040
acaggcgtga gccaccgcgt ccggcctgat tattaaccat cttttatttg tgccttacta	8100
gagctctgta tagagaagag ttgtgggctt catctggact cttcaggaca gagaacaaag	8160
gggcataggc acaggaggga agtatggtag caccagaga gatagataaa gccatggtca	8220
ttttttata cacacacttt aagcatttta tttttcagca gaaaacaaca gccttgacac	8280
agatgatcac tttaaaccat cacctcggcc aaggagtatg ttgaaaaaga aaagtcacat	8340
ggaggagaag gatggactag aagataaaga aactgccctc agtgaagaat tggagttaca	8400
ttctgcacct tcttcccttc caacgccgaa tggcatacaa ttagaagctg agaaaaaagc	8460
attctctgaa aaccttgatc ctgaggttag cactaccact aaactgttga attgtgttct	8520
tgaatttatg cttttttatc tgattatgaa aaagagaagg agagaatgaa tttgtgtgcg	8580
tgtgtgtgtg ttttacatac tttcttctgc aactgataag gaaataattt ttaaaaatac	8640
actgtattcc accgagtcta aaactgcac- aattgtaaga cgtagcatta ttttacatac	8700
cactaaggaa gaaggaaatg catccaatta aactataaca caccagtgat ttagaggttt	8760
atccagtttt agagaaagta aaatgtcaaa aagtgttgct tttctgaatc tatataatag	8820
tgtttatctt taataatttt ttaaatttat gtatctttga attatgtaat ttatggctaa	8880
gaacaatata gtcagtgtca ttttatttat ttgattttat tcaactcaaca aatgtgtgtt	8940

## s644PCT88.ST25

gaatgttcat	ggcactcttc	tgtgttcttt	gggttatgtt	ccaatagcat	taaatgtggc	9000
ctttcaggtt	tccatcaggg	aatttactat	gcattgttat	taagggagaa	cacttcgttt	9060
ttctctttgt	atttcactat	gagaagcaaa	ctgtcccttc	tgaacatttc	agaagggaaa	9120
agtacaggaa	gaacatttct	tccccataat	ctgcttgggc	agattagggg	actgcatgcc	9180
acctggccaa	gcttctttct	ttttctcatc	gcttgtctgc	agtgttgggt	cttaaggatc	9240
tgtctcttgg	gaggtgaggg	agaaggtgct	gagaggagct	cttttgtgca	atgactaaat	9300
gggggaatcc	ccctaattca	gactggaagt	attaggaagc	acaataggct	accaattcaa	9360
atcttgttct	gcagttgagc	tttaccagta	aagctgacaa	tttgatatac	gcctaactga	9420
caccaccatg	ctgtttctta	atttgttctg	aaaaccagaa	gaagaaaccc	aagcaaatac	9480
tttatattta	agaaaattat	ctgatccatt	gaatatgttg	ctagtttctt	gtagctgctg	9540
taacaaattg	ccacaaactg	gttaacttaa	aacaacagaa	atgtattctc	ttagttctgg	9600
aggtcagaag	tccaagatca	aggtgtttgc	agggccattt	tcctctgaag	gcatcacgga	9660
agaatccttc	cttgccctct	ccagcttctt	tctagtgggt	gccagcagtc	catggcattc	9720
cttggttgt	agctggcttg	tagctgcac	attcccttct	ctgccttcat	cccatgtggc	9780
cttcttccct	gtgttttctc	tgcattgtctg	tgtctcttct	ttctcttaaa	aaaagacacc	9840
aggcattgga	tttagggccc	accctaattg	agtgtgtcct	catcttatct	atttaaagct	9900
gtaaacacct	tatttcttaa	gaaagtcgta	ttttgaggtt	ctggatgaac	atgaattttg	9960
gggcattaat	gttcgtatgt	taaacctagc	attcccggga	taaactctgg	ttagtcatgg	10020
tgtgatattt	tattgtggga	tgtgatttgt	taaaattgtg	ttaagggttg	catctatatt	10080
tatgaagtct	attgggtctgt	aatttttttc	ttataatgtt	accatcaggc	ttgggtatca	10140
aatgagttgg	ggagtgtctt	ttcttcattt	tataaaagtt	tggtatcatt	attttcttaa	10200
atgagaggat	tcaccagtac	aattatctgg	gcctggaatt	ttctgtgtgg	agacatcttt	10260
ggcattacat	ttgatttttt	aaatagggtat	ttcagtactc	acattttctg	ttttgccagt	10320
ttggtaattg	tgtctatcaa	gaagtttgtc	catttcattc	gatattgtga	gtttataaac	10380
agagttgttc	acgatagtcc	ctcattcttt	tgatgactag	gattatcatg	acatttcatt	10440
tttatttcta	acatatataa	tttgtgtttt	gtgtctttcg	tgtctaatct	tgataggcat	10500
tgttagtttt	tattaaacgt	ttttaagaac	cacttcggct	ttgtcatatg	ttggtgcaaa	10560
agtaattgca	gttttgccca	ttactttcaa	tgacaaaaac	cgcaatcatt	ttgcaccaac	10620
ctaataattt	tctctattgt	ttgtttaatt	gattttcagt	attatttcag	tattattcag	10680
tattatttct	tttactttct	tttttttttt	ttgagacaga	gtctcgttct	atcgcccagg	10740
ctggagtgca	gtggtgcaat	cccagctcac	tgcaagctct	gcctcccagg	ttcactccat	10800
tctcctgctt	cagcctcccg	agtagctggg	actacaggca	cccaccacca	tgcttggtta	10860
atttttgtat	ttttagtaga	gacgggggtt	caccgcgtta	gccaggatgg	tctcgatctc	10920
ctgacatcgt	gatccaccca	cctcggcctc	ccaaggtgtt	gggattacag	gcgtgagcca	10980

S644PCT88.ST25

cggcgcctgg cctctttttac tttcttttgg ttttaatttgc ttatcttttag atttgaaaat 11040  
 tttctcattc atttttaaga ttttcgtgat ttctgctaaa cctgttgaaa ggtgtaaact 11100  
 ttcttctttg tactgcttta gtggccccga ttttttgatg ccttttattt ttattatcat 11160  
 ttctttaaat atatatttta acttcccttg tgatctcctg ttttaaaaaat ttattttttt 11220  
 agttgaaaaa taataattgt acatggggta catagtgatt tttcgataca tataatatat 11280  
 agtgatcatt gtgatctctt ttttgaccag ttggttattt tatggtgatt tattttattt 11340  
 tcaaatactt gttttttctc tagatatact tttgatgtta attataagtt aattttgttg 11400  
 tagtctagag aatgtatctt acatgatttc aaatttttaa aaattattat tattatttct 11460  
 aaatggccca gcttttagtg atcttgtgaa agtctcattt gcatctgcaa agtagatgtg 11520  
 ttctccaggt gttgaatata atgttgtata atttaagttt ggtcaacatg gttggaata 11580  
 tcattcagat cttctttatc cttactgatt tttcatccaa tttgtttacc cgttaccaac 11640  
 ttaggggtat taaaatatcc agttatgttt gtgggtttgt ttatacttct ctttagttct 11700  
 gtcagtattt tataactttg ttatcaggca catacacatt tattattatt atgttttgag 11760  
 cattatgaaa cgtctctacc tctggaata ttcctttcct tatcttatag attgttttgt 11820  
 gtaatacttc agctttctta tgacaagtgt ttccatggta tatgctttct atcttttttc 11880  
 tttcaaaacta attctgtctt ttcattgtaag tgaatctctt acaataagag tttggtgtca 11940  
 cttttttatt aagtctgaca atctatgcct tttaatgtag tgttttagtcc atttatgaat 12000  
 gttttgtcca tttaatgtaa atactgctat gattggattt aggagcaatt tgttgctctt 12060  
 tattttctat ttatctgttt tttaaaatta ttgtttttat tgttgtttct ctgttactcc 12120  
 tttcttgcct ttttttgagg agataatcat gaatctttta gttttttatt attattgacc 12180  
 ttttatctat atttgtttgc attgtatttc tcagagtga tcagtggatt acagaatata 12240  
 tctgaaaatt atcacaatct atttagaatt gatattgtat tgtttcacat ttgatctaga 12300  
 aaccttgga taatatagtt ccatatactc cctcatccat tgtgctattg tcatatatta 12360  
 tatctacata tcctataatc cccacaatag agttataact ttttcttaaa gagcccttcc 12420  
 agttttttgt attagacttt taaaaaatta aagaaggcta gaataaatat atattatata 12480  
 tctactgtat tatatatgtt atatattata gataacattc tattgctaaa tatagataat 12540  
 atatatttgt agacaatatc tatatatagg taatatatat tctattctta tatattatat 12600  
 agatatataa catctatata atctatttat agatattaca tatctataaa tacatatata 12660  
 atttctaggg atcttcattt cttcctgtag attcagatta ccattttgtg tcctgtcagt 12720  
 cttacaaact tattttacat ttcttgtaat acagggtttac tagtgatgga tttttctcag 12780  
 tctttgcttt tctaaaagta tttgtctcat ctttgttttc aaatgggtggg tgatgtgatt 12840  
 gtattcttct tgtctaacag ttgccttctt ctacctccag ctctttatag gtttccattt 12900  
 ttattggcct ctcttgtaat cattcatttc attgtcctct ctatataatg tgttgatttt 12960  
 gtctgaatgc tgtcaggaat ttactcaag attgtggttt ttatcttttg attacagcaa 13020

s644PCT88.ST25

ttgactgca tggcgcttg gtctagcttt ctttatgttt attctgcttg acgtttgttg 13080  
 agctttccaa acctataagc tgatactgtc tgtgaaatgg gaagattgtt atttcccacc 13140  
 ctatttttca tcctctcctt ttggtactgt agttacacat gcattgaaat ttgtgctata 13200  
 tctcactgat ctctgagatt ctgtttatat ttcttaaadc ttttttcctc ttgtttttta 13260  
 agattgaata acttgtatta cttagtcttc acgtttacag attgtggtcc ggagaatgta 13320  
 tcttttatga tttcaaattg tattaaatta tttgttttg ttttaatggc ccagcaaaag 13380  
 ggtatgtcgt gagagttcca ttgacagttg caaagtatgt gtgttttcca ggtgaatttt 13440  
 ttatttctact tattgtggtg ttcaacttca gattttctat tggatatttt tctgtttttt 13500  
 aatataaaat ccccatctt ttacagccatc atgcataat tttccccaaa gtgcttgaac 13560  
 atatttatat tagctatttt aaagtccttg tctgctaact ctaaaacgtg agtcactctt 13620  
 gggttggttc ctattgacca ttctctgttt ttttattttg ttttttaaata aagtgtcacc 13680  
 attttctgtt tctttagtga cttttgattg aataccgggt gttctgaatg atattttgta 13740  
 gagattctgt attcttttat gtcccttcaa acatattttc tagcaagtgg atatcatggc 13800  
 tggacacaaa ttccaatcc tgtttctcct gcagtggata tcagctgaaa tttctgctta 13860  
 attcttttca gtttctagct tctatgcttt tacaggatcc tctgaggtct cccttatgcc 13920  
 acaaataagag gtggtaaagg tttttggtga atttcatatg cagattttgt ggtcactgtc 13980  
 ctctgctatt ttccacatac ttattggctg atctgatggc cctagactca gtccccgtt 14040  
 ccctcaagtc attccaccaa ggctgtagcc ttctattact tgagctgcat agactggaga 14100  
 atgccttctg gcaaaaagct actaatttgc agatctcctc aggtgaagct ttatctttca 14160  
 gggtagactc cagtgtctca gcacttcttc catttttctca aatgttttct ctccattgct 14220  
 ttgacatat aatttcctt gcaccataa aatactgcgg agaaagaaaa ttaaagtatt 14280  
 tgtacaacaa agttgaactt cctacattgt aatatcatta ctttaggct agatgattct 14340  
 atgaagaaat gtttacctta gatagacaaa tataattatt tcatatcaga tagaattttc 14400  
 agaattttga ggaaaactca agtgcattgc atctatgtgc ttttctatc taaaatattt 14460  
 ggaagtagcg gcttacttga ttttattaaa tgctttcatt tggataacta gtaatatttg 14520  
 cttggaacta aagtatttta cctgtcttct ttatgctttc cttcaaagga taattgtagg 14580  
 aagagctatc aaaatcaaat cttggcctta aatatttata agaaatgtga ttattaagta 14640  
 ataggagttt tgaaaatttg taaaaataa atagagaggt ggtggtagtt aaagaacttg 14700  
 aataactctt tcagtgacct cttttaatga ccaagacatc aaggcttgaa agtaaagcat 14760  
 gcttacctcc attggcttgt cacactttgc gtttcagcaa caaatgccta aataatgcag 14820  
 atttcagagt tatgcactat ttcaatttgt agttttaata atgctattgt tcccataaat 14880  
 gtttaattatt aaacttatgt ggcaaatgta ttttttttg cgaaaacagg attcatgctt 14940  
 aacaagtcta gcatcatcat cacttaaaca aattcttggg gattcttttt caccaggatc 15000  
 tgagggaaac gcatctggaa aagggtggtta tatctaataa ttatatctta tatgtgaact 15060

## s644PCT88.ST25

ctgtactact tagactcctg tttgtaagag aaataatact ttgtatagtt ataagagaaa 15120  
 tatatgtttt tatgtgtttg agttttaatc ctgactatgt agttaactaa ctgtgatttt 15180  
 ggatgcagaa cttaatctct cagtgcctca atttccctaa gttatattat ttgtctcata 15240  
 aggttattgt gaaaattaag tgatatagtg catttttagcc attagcctag ttaatagccc 15300  
 aagtggagtg agcacttaag gtaaactact gttatgtatg tgttgctgtg atattctgca 15360  
 ggacaacata atagctaggt ggaattttta agtgagacta agctagattc caatacaggc 15420  
 acaattacat aagcaaagta actaaccttt ctgaccctgt atgttgatct ttaaaatggg 15480  
 taaaataaga gtaatttgcc ttataggggtg ttgtaagaat taaacatgta aagcattttac 15540  
 agcaatacca tagtaagcac ttgggtgtgat atgtgaattg ttaacataat ttcttttctt 15600  
 agtgatacgt agcttaatga aacctaaaag acatagctat ttctaggtct gagatgtgta 15660  
 atgaacattt tagtgcttac tatgtagtat catttttgtc attttacaga tgagaaaagc 15720  
 tgaagtgcag tgacttaggg aaacataccc aaggtcagt atggaaccat agttaaatct 15780  
 tgagttccaa agttcttgtt cttttcactg aacagattaa cagctccaaa gaatccaata 15840  
 gtgaattgag tgattttaag cccatgttac ctcaaaacaa attccaaaaa aatggtcata 15900  
 atgaaaccaa cagaattaag acttttcaca gtaaagattc aggttttagct gcaagggtgga 15960  
 cgttggtaga actgaaagtt ggtgatccca ttccaaaatg tggtaaaatc agaatagtag 16020  
 aagcaattct ataaatgcaa aactgaatct tcttatgcc gagcttgagc ctgtttcttg 16080  
 gagcactgag aggataagca ataggcttgt ctttattgcc ctttatggta tcagaggaag 16140  
 tactacatct tggtgagatg aaactcacta gagactgtgt aaaattgcat taattcttgg 16200  
 ttctttctgc agctatacaa ttcaacaatt gtactactag taactgtagt agcctagaga 16260  
 ggtgtgacac cttcttatgc agcgtgttgt tccagctaag aaactcaggc tttagagtta 16320  
 aacaaatatt gtcattctac ttacttggtt tgtatatcaa caagctcttt tgacatgtcg 16380  
 ttgttttagg gtagttattc cattctgttt attaatatgc tatttttcta agtactagat 16440  
 ttgttaagtg cttcattagt taagcctaga ctattttttt ttgtaaatca ctttcgaaaa 16500  
 gagtttatgc aagtttaata tgataacttt tcttcatatt ttgcaagaaa aaagagttta 16560  
 tagatagtcc tcatttaaaa gaaagcaaat gaatcaagta ttaccttat taattcagaa 16620  
 ggggggttta atgctattac tctgtctcaa aatagatcca aatgaagaaa tcaactgaaa 16680  
 ccataattcc ttgaaatcag atgaaaataa agagaattca tttcagcag accatgtgac 16740  
 tactgcagtt gagaaatcca aggaaagtca agtgactgct gatgaccttg aagaagaaaa 16800  
 ggcaaaagcg gaactgatta tggatgatga cagaacagtt gatccactac tatctaaatc 16860  
 tcagagtatc ttaatatcta ccagtgaac agcatcttca aaggatattg taaaaattca 16920  
 tacttttcat actacagctt aaaacttgaa atagaacttt aagaaatttt atcttctgtg 16980  
 ttatatactt ctgaattacc agtggaatat ttatcttttg atagtatat tgtattgtca 17040  
 catggttctt acttaatcca ataaaattta actttaagga aagttttagt tgaatataat 17100

s644PCT88.ST25

gaaacccagt gtttaaaaaat tatcagaggt gtgtgatcat aatatacttt taaatgtctc 17160  
 agaaatgcat actcatagtgt tatatatctt cataggtctt catatcttaa aaatataact 17220  
 gtctggaata atttctgaga ttttaaatta gagttatgtt tttggatatt gttttaaac 17280  
 gtgttaacaa ttttaacaaa aatcttaaag aaatgtttat caacagttta tcaacatctg 17340  
 tgcttcttta aaatagatgg ttatcatcag gaacattagt attattattc gtatttgatc 17400  
 ctttgccttt atttcctaata tttcaaaaata atgaactggg gccctggcaa cctccagagg 17460  
 tgatgaagtt gctttgtttt ttcttttttc aattcatgta aatttaatgg ttacaagtgc 17520  
 ttttttgta catggatata ttgtgtagtg gtaaagtcag acttttagta taaactaaaa 17580  
 tgtacattgt acccattaag taatttctca tcccgcacct ccctctcacc tttcctagtc 17640  
 tccattatct attattccat accctatata catgtgtaca cattatttag ctctgacttg 17700  
 taagtggaaa catgtaccat ttgactttct gtttctgatt tatttcactt aaggtaatag 17760  
 cctccagttc catccatgtt gtaaaagata ttatttcttt tctgtgtggc tgaatagtat 17820  
 tcctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atacacattt tctttataca 17880  
 atcatatgtt gatgtacact taggttgatt ccatactttt gctattgtga ctagtggtgt 17940  
 gataaacatg agtgcaggta tcttttttat ataatgattt attttccttt tggcagatac 18000  
 tcacagtggg gttgctggat tgagtggtag ttctatatct agttccttaa gaaatcccca 18060  
 aactatcttc cataaagatt gtactaattt acattcttac caagagtata caagcattcc 18120  
 cttttctctg tgttctcacc aacatctgtt acttttttaa ctttttaata atagctaaat 18180  
 attctgacta gtataatata tctcactgtg gttttaattt gtgtttctct gatgattagt 18240  
 gatggtgaac attttttttc atgtttcttg gccacttgta tgtcttcttt tcaaaaagtc 18300  
 tattcatgtt ttttgcctc tttttagtg ggttatttgt tttttgttgt tgttgttgag 18360  
 gggaaacatta ttattataac cttaagaaac agatatgtaa tatgtaggat tacttgtccc 18420  
 tacattaaat tgtgcctgag tgctatactt taaaaattta tgggtgtagca ttttcagtct 18480  
 ttgtttctcc tgaatttgct attatctctt gtagctgcaa ttagctagca gctctgtgtg 18540  
 tttattatca gcggaagaaa acagggctag ctgaaaattt gtgtttgagc aatactttta 18600  
 taacataaaa tacaagcttt tcttaaaatt gatgaaggag gttcattaag ccatgttcca 18660  
 ggtatatcat ccttagctaa tttcttttag aaaaaaacac tactgctaag ttagggatgt 18720  
 gtttattatg tctgtgctct cactttacca ctagcaccca tcagtctgtg taaagtagaa 18780  
 aagttgttcc ttaaaagaag aaaggatatt ccggagttaa tagacaggat tgtagaatgt 18840  
 ctaatagagg caattctaaa ttagaacagg catttcatat gtaacaagta aggttgtaac 18900  
 ttgtttcttt tgactggacc cttggcctca ttcttactct ctactgaatg accttttcta 18960  
 aacagaaata taatcattct ccattaaagt cttttgttg gtttctcatc acaagaattc 19020  
 catccagact cctcatcgtt gcctagtgat ctacactggg tcttcctga ccacgtcttc 19080  
 ctccgctttc cctgccattc actatgcttc agctccattc acctcttct gtttttcaga 19140

s644PCT88.ST25

gataacaggt tccgtccctt ctcaggcttt taccacttg ctgtttcttt ctttcataga 19200  
cctttcggtg ggccctttgc actcttagct ctgatgtcag cccctcagga cagccttccc 19260  
tgaccaactt ctttaaagca gctcctcagc cccactctag tcattctctg tcaactgcaca 19320  
ctatttttatg tccttcatga gccatgtttg cttatatatt tatttttgggt catccgtctc 19380  
tagaatttaa tattcttaag ggcattttat tcaactgattt gctcccaatt tctactgtgt 19440  
ttgacacata gtagatgctt aaagaatagt gatttactgg cagtttggct tctaagccta 19500  
aaaaggatag ttgtcatgaa taaatcatct ttggcatttt ctgtttaata gaaaacaatt 19560  
gaagatagaa atataaagaa taaaaagtca acaataata gagcatccag tgcactgcc 19620  
aggaataaaa gttaccaata ttgtcattt atgggcttgc attctagcaa agctagtttt 19680  
aatttaactt tcataaagta aatttcattt ggtgttactg tattttcttt ttatttccat 19740  
ttcataaaat gaaagtagtt aacttcatga taaaaccct tggttgatga tattatttga 19800  
aataaagtaa ttataaaaa gtaagtctat tactgattgt tttagtgcct ggaatgttta 19860  
tgcaatacct ttgctctcca ggatcgctcct aggaatattt ttcttctttc ttaatgtcag 19920  
tgattaggga ttctttgtgc tccagactgc ttctggaata gagcttcttt ctctacttt 19980  
tcctgagaca agcaatataa aatggtaata aagctgaagt ctagcaatga tacttattca 20040  
ttatcaagta tcattgtcta acatgagaaa ttgtactgaa agccttcaga atctatgaac 20100  
taagtaggtt tattaaaatg attatctgta tagcttcatt cacaccaatg ataatgaatg 20160  
cctaactcat aagtgcta at caaaaacctt ctgaatcttt aaaattatcg ttagtcaaat 20220  
tatcattaat caaataaaac agagctagca agctttttct gtaaatggcc agttagtga 20280  
tatttttaggc ttgttaggcg atacagtctg tattggaact actcatttct gctattttaa 20340  
caggaaagca gccacaggca aaacttaaca tgaatgatta cagctatgggt gcaataaact 20400  
ttgtatatca aaaccaatgg ctggccaaat tttccacca atccctgata tagatagtag 20460  
tattctttct aattttatat ttggaatgct tcatgtaaca aaatgatgaa agaaaatatt 20520  
aaaagagtga ttataacct ctgtattgtt ttttccatgt aacttgagaa gtggtccata 20580  
tttcttaagt ttctaattac aaatatttaa aaagagcaat cattttaaag ctatataact 20640  
taaagttata aaatttaa at tatgttgaag gggacatatt taagttatgt ccccttctac 20700  
ataattta at tcttttga tactaagact gtacatttta cctacatcat tttcaaagta 20760  
attataattt gttaaattat aatgtagttt ccaatttttt ttttgagatg gagtctcact 20820  
ctgttgctca ggctggagtt cagtggcatg atctctgctc actgcaacct ctgcctcctg 20880  
ggctcaagct atcctccac ctcagcctcc agggtagcta tgactacagg catgtgccac 20940  
cacgccagct aattttttgt attttttgta gagacaggggt ttcaccatgt tgcccaggct 21000  
gggtcaacagc ccaacaggat gagctcaagt catccacca ctttggcctt ccaaagtgt 21060  
gggattacag gtgtgagcca tcatgcctgg ccagttttca aatattatac gtgcatattc 21120  
taacagatct ctcttctacc aaatgcaatt gtaatatatt gtcttgattc atttggatct 21180



## s644PCT88.ST25

tttcagatta atgacctctg agtttttgaa gaaatctagt tctaaaagga gaactccatc 21240  
 gacaactacc tcttctcact atttagggac tttaaaagtc ttggaccaa aaccttcaca 21300  
 gaaacagagc atagaacctg atagagcaga taacataagg gcagctgttt atcaggtaaa 21360  
 aaaggaaaat atttttaaga gaagaagaat gatcactttc ataagcctac actgtttata 21420  
 aagaataaag taatcctgat agaaaatgat ggtttaatac tttaaattat tgagaaagag 21480  
 tttcctttta atacatgagt aatcatattt tactaaatta tttgcttcca cactttgcat 21540  
 aactgaccat agttgttttt aaagaaagaa tatgccattg caatttatag aaatacagca 21600  
 caagccaaaa cattgtaaag tctatatatg ttttcatttt tttcttcttg aagtttatat 21660  
 gaacaaaagg agttattatg aacaaaaagt tattaaattt tttctttcct gagatgttgt 21720  
 taggcgtaca taggaaaaag attgtattaa tttattcaca attctaaaag tctttttttg 21780  
 tcttttttag agtagaatag tatacttttag aaaattgtac atgtgaattt cagagaaaat 21840  
 gttaatatata agaattctaa ttcacttaag aaatttttaa tattatatga cctttttctt 21900  
 gttcttatag gagtgggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa 21960  
 aagaattgaa agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag gtattctgac atatagaagt 22020  
 aaaaatgttt tggattttta tttcagtaaa atatccctga atatataact tttctaaatc 22080  
 agctttttta atggcaaaat aacttgata ttaaagaaat gatttccggt tttacttctg 22140  
 ttttacttta tacatttttag tttgatataa ctgttttaca tgaaaacaga ttttaatttt 22200  
 gtatatgtat aggatagctt tgttcctgct gattatgaag ttattattgt ttatgagcac 22260  
 ctaattcact tttaaaagtt gatttcattt agaacttaac caagaaggcc aggtactgtg 22320  
 gctcatgcct gtaatcccag cactttggga ggccaaggca gatgggattc cttgaggtct 22380  
 ggagttcgac accagcctgg gcaatgtggt gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaaa 22440  
 ttagccaggg atggtgggtg gcacctgtaa tcccagctac tcaggaggct gaggtggcag 22500  
 gatcacttga acccgggagg cggaggttgc agttagctga gatcgtgcca ctgtactcca 22560  
 gcctagggtga cagagactct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa ggcacgacaa gataaaggat 22620  
 cattagacac tagttagcct tcaattttcc tcttttctct cttgaatttt ataagtatct 22680  
 tcaagtccaa cccctacctg aactcttgat ctgtatcctt tcccattgaa tggaggtgaa 22740  
 cttttgttcc tgtctcttct gtactgagtc ttttcttcta actcctgctt gtaatacgct 22800  
 cagttatttc ttatcttcta aagtcaaact tctggacaaa aactccagtg tgctgttcaa 22860  
 tactaaaaat agatttagaa gaaaaatatt ttccaagggtg aactgcacga taatgcgtca 22920  
 gtagtgaagg gagcagccct ccagggggcg tgcctgtcta tctgttaacc acgttcatag 22980  
 cagtatgctg ctgtgggtcag tgccataccc cttctcattt gattttcgta gctctgtgag 23040  
 gtagatagta ctttgacctc taaattatgt taccacaata ttaagggttt atgtcattta 23100  
 atattgaaca ataaagcaaa catagaatat tatgggatta gattgaagga agtaaaaaaa 23160  
 taacataact tgctatacag tctccaacct atttttcagt cgagcacata ctttcaacat 23220

## s644PCT88.ST25

ttggaataca	tttgtgcagt	aagaacttta	tgttttgata	ctattcaaaa	ttaagattta	23280
aacaaaaaat	ctgcatctta	ctgcatggct	tggccaat	gccttactct	aacttacttt	23340
ataagcccat	aactttactg	atTTTTTTTT	caaataat	attatgaaaa	ttttactata	23400
ccacttagcc	tattacagtt	tattttgata	taatttgttt	agtacacttt	caaaaataat	23460
agttgacatc	tttctcatta	ataggtcaat	atgtgataaa	tgtttttaga	aaaggacggt	23520
ttaaaaccaa	tgaataattc	agataacatt	ctttgtaa	tatctaagcc	attctaaata	23580
aattacctac	tttgaaagtt	aatttctaag	tataatgaat	atcagaggac	taaagataaa	23640
tgtatatgtg	tatatattata	tctagccata	tttgtgtcta	tgtatatata	catatatatg	23700
tatatcactc	tattatTTTT	tccactgtag	aaaaaagctg	ctaaaagaga	agaagcatta	23760
gcatcatttg	aggcctggaa	ggctatgaaa	gaaaaggaag	caaagaaaat	agctgccaaa	23820
aagaggcttg	aagaaaaaaa	caagaagaaa	actgaagaag	aaaatgctgc	aagaaaagga	23880
gaagcactac	aagtattcag	aactttgcac	atcttaatta	ttttaaaaca	tttgaaatcc	23940
aaattaatga	ttaaccatat	ttttatttat	tttcaaata	tcacagtaag	aaaattattc	24000
tgaactTTTT	caggctTTTT	aaaaatggaa	agagaaaaag	atggaatatc	ttaaagagaa	24060
aaatagaaaag	gagagagaat	atgaaagagc	aaagaaacag	aaagaggagg	aaactgttgc	24120
cgagaaaaag	aaagataatt	taactgctgt	tgagaaatgg	taatccaaaa	tcataaatat	24180
tttgatatat	tttaaattat	agtaacactt	caggatttta	taaaatttat	ttacttgaaa	24240
tttagtaatg	catttcaatt	tcattactgt	caaagatgta	ctaggggaatc	tttattatgt	24300
atTTTccttt	aactctccag	tgTTTTtatac	tatgctctat	aggaatgaaa	aaaaggaagc	24360
TTTTTTcaag	caaaaggaaa	aagaaaaaat	aaatgagaaa	agaaaggaag	aactgaaaag	24420
agctgagaaa	aaagataaag	ataaacaagc	tattaatgaa	tatgaaaaat	ggctggtagg	24480
tattattttgt	caatgcactt	tcgtctTTTT	catgtacctt	ttgtgtcttt	tctgtcccta	24540
attctaattc	tatttgctcc	agacctactg	atcatttcta	cctggaatct	gctttgttga	24600
attcaagctc	tcctcctgca	tatagcatat	tttctttgac	ttagtcattt	ctattaatgt	24660
ttctactatt	ccctcaaaca	cccaggctga	aaacttggtta	taatcttctt	ccttacctgc	24720
atccccacat	ttaccattta	ctattcatgc	ccattcttcc	tttgctgtga	ttctcacatc	24780
taacatagaa	agaagacaag	tttactattg	agggtactac	gtggtggaac	ttggtcatga	24840
caaaaagtaa	cactgaactt	aatagtgaga	aaattattcc	atctttttatt	ctcttttgat	24900
gtttctgatg	acctcaagga	gaatctctta	tttaggaatt	tttaatgaaa	gagagcaggt	24960
ttgaggTTta	ggaggagcaa	tagctagctg	aaccagatat	gtgtatatat	ttgatttcac	25020
tttacttatc	tttataaaaag	ttactTTTTg	ttgatgtcaa	gcaaaatatt	atTTTccatt	25080
ttagaatatc	aatataaata	tgcatTTTgt	ccatgTTTat	ataagtaata	cattactatg	25140
aataaatact	ttacataagt	aggtaacaca	ttcatatgaa	tagttaacat	attcatatga	25200
ttcagcaacc	aaaattatag	tattTTTgca	ctagaagtct	atccagtcag	gtttcctatc	25260

s644PCT88.ST25

aaactttaaa acaactcata ccaatcaact aaatcatcca gggtgttttt gatttgcatt 25320  
 tctctgggta gaattgagct tgaatatctt ttcatttgta tacaggccat ttatctatta 25380  
 ttttctctgt aaattgtcat ttcatagact ttgcacactt ttctattaga ttgttggttt 25440  
 tttttcctta ctggtttcta gaatcttttg ttttgtactg gggaaattag cctatcattt 25500  
 tttatatggg ttgcaaatat ttacccccac tatattgttg gtttcccggc tttccttata 25560  
 gtatctcatg ccatgaagaa tttaaatttt aggtgtcaga tttctgtttt ttttttttgg 25620  
 cttttgattt tcaagcatag ttgaaaagac ctacacaatt tgagattaaa cagaattatc 25680  
 ttatttttct tctaacaact ttgtgacttt aatatcttaa tgttttaaca tttgttctgc 25740  
 ttggaatttg ccctgatata tgggtgggaaa tatgatttca acttttagttt ttccaaatgt 25800  
 atcctttata aagtagccca tttttacca ttgatttgag gtgctacttc tgttatatga 25860  
 taccttctca tgttttcggg tctgtttctt aactttctgt tccattgggtc agtctcgtga 25920  
 ttccagtgcc acacttccat tattaggctt gatatgtcta aatatctgct tggattcatc 25980  
 tccctttata gttcttcttt cacagtcttt ctgaccagtc ttgtttattt attttttcca 26040  
 taaacttaag aatcagcagt agttagaaag gtacatggga ccaaaatgag cgatttaaag 26100  
 ataggataaa aagataaaac aataataaac ttaagaaaca tgccagacca acataaagaa 26160  
 aattgtagaa ctctcctgaa caacacaaat gaagacttga gaaaatggat cagaattgcc 26220  
 catgcacaga aacacactta accttataat gatgtttataa ggatgtcagc tctccctgaa 26280  
 gtcatttaat gcaatcttaa caaaagccaa caggatttac tctgtgtgtt gagtttagta 26340  
 ctgctatatg ctaattcgat gcagagaaat agtaataaaa taaggtaatc aaaattgggt 26400  
 caattttgaa tgaaaaaggt agtgtttcat gatgatttcc ttaagttaat ctgttaaata 26460  
 atgctatgtt ctaaaaaaaaa atttaaagtc cacttatatt aagaagatgt acactgactg 26520  
 ctagtatcaa ttaggggaaat taaatgtaaa catttgagtt ttccatttta attccatatc 26580  
 ttcataaaaa tggaatagaa tttctttaat aagtcacatt taggtatact gtttttaatt 26640  
 atagcactta attacattgt cattcttctc agtcctctga agaacaagaa ttcctcaaag 26700  
 accaaagaca aaataacatg tttgatatct agtaaaatgt ctgcaaatat agtacaccta 26760  
 taaacacata aacatacatg ttacagatcg gttctccttc ttaccaaatt cttattgaaa 26820  
 tttgtttgca gatagaatag aaaaattgcc cctgtatagg agtctaataa cttcagtttt 26880  
 catggaaaac aacatctcaa gctttttata tacaaactag tttgaacagt aagcatttgg 26940  
 tgggtaattg ctttagggga aagttaatag ccaaagatca ggtaagacta aaatattttt 27000  
 cttgccaat accagattaa ttcataatta ccttttagtaa gaaaataagc aaaaagctca 27060  
 gttttccaca aataaatgtc tgaaggactt ttaacaagg ttcttttaata tactatcaag 27120  
 gtgactattg attcttttga actgatatta cagttaatat aattgtctat ttgctaccct 27180  
 ggctttacag ctccctgcta gtaagatgaa gcatatttca agttactgcc ccctcatgtt 27240  
 aagtgaattt acaaaaagag atttattcag tcaatttctg tggacacagt ctggtcactg 27300

## s644PCT88.ST25

cttttcttcc gcctagctag atgggtctgtc tctaaaaatat taaaatgatt gaagatgatc 27360  
 taattacagc tttgcttttc tcaattaaaa ttctgaaagg aagtttcctc tttgccttat 27420  
 tagaaatagc aagcaaaca acatgcaagc attccttatga catggaatga ggatatgggt 27480  
 gttaacattg acaaaaaaca aacaaacctc ccacttcact ttgtttgtta catgtgaatg 27540  
 gaaagcttgt cctgtattgc catattattc ttgtggcatt tatatatata ctgatgaaaa 27600  
 gatgcataca tacctaataca ttttccataa tgcctttcct cccaagccat caacctgcag 27660  
 aggcagggtt cactaagggt tttcctgtc cttgaggaat atgagaaaaa taccaagatg 27720  
 aagaaaccac caaaccttat agtgtagca gagacataaa gggacacctg gtgcccctct 27780  
 tccatttctt gtctcctgcc ttctgccaag ccttagtcac aatggatatt tttgtttcct 27840  
 cccacagcac acattttttt tcccactctc agagccctca ccactactgt ttgcaagcaa 27900  
 agctcttccc cgatatattat cacgagtggc ttctcttctc catcatgtca cacttcaaag 27960  
 ggactttccc tgagtccatt tttgttgaa agtaataact cttttttatt cttctcata 28020  
 gttttaaaac atgtttcaga gaaattcaca caatttgga ttatctgttg tttattttct 28080  
 ttgtttctgt ccattttgaa agttccctgg gggacaggga ccatatctgt gtgttgggat 28140  
 tttaaaaaat tattttttatt tgcaaatgac acataaaaag tgcacatatt tatggaatac 28200  
 agtgtgatgt ttccatctac attgtataca ttgtgtaaca atcagaaatg actcacaag 28260  
 gtaggcaaaa tgtttgatgc aaagatatca ttaatattta ttataggaaa gtacacaaat 28320  
 tactaaaaat taaaggcaaa taccatacat ttaaatgggc caaataattg agcagaaaat 28380  
 ttacaaaagg ctaaagaaat gtttgaaaat gtgctcaagt tcaataataa agaaacatga 28440  
 ggcagaattt ttaactattt gtaaaaaatt tgaagtatct cactactgtca tgacatattg 28500  
 aaactttgca cccagtaaac ttacttctga gaatttggtc tcacgaagtc accaccaact 28560  
 tataacagtt actatatatt agttataatt ataggtcttt ttttctattt tatacaattc 28620  
 ttttttaatg ttttcacttt taaagtttaa aaaattaagt gatattagta cttgcaaatt 28680  
 gacaatgttt actaattttt ttcttgtttc cttttttgt ttgtttgttt ttttgagaca 28740  
 gggctctact ctgttgccca ggctggagt cagtgggtgca atctcggctc actgcaacct 28800  
 ccacctccca ggctcaagca atcctcccat ctcagcctcc taagtaggtg ggactatagg 28860  
 catgcaccgc cacacctggc taatttttgt gttgttttgt agagatgatg tttcaccatg 28920  
 tttcccaggc tggctcga ctcccaggct caaacaatcc acccacctta gtctcctaaa 28980  
 gttctgggat tactggcatg agccaccatg cctggcccta cctgttattt ctttatgatc 29040  
 tgttaaacta ggaagtgata tataaatatc ctataatgga ttattttgtt cttcagcaag 29100  
 caacctgatt tgaaaataat aatcatatat gtacataaat ttatagtgtt ctattttctc 29160  
 tttaggaaaa taaggaaaa caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgtcattcct 29220  
 ttcttgaaag tgaggcactt cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttcgcaaaag 29280  
 tgttttgata attctagttc ttacattatt tgggtattta tcggtttgcc aatattagcc 29340

## s644PCT88.ST25

atagattttaa aaccattcaa ttattttatag ttagaggaat atattttaat taaatgccag 29400  
 acactcctgc tgacaatgaa agaaatactt tggaatgtaa tcagtgaag ctttttttg 29460  
 aactgtagat aaactgcctc aaacaaagac ctaataatca gattgttttt accattaaga 29520  
 tacataagat tttatcatgt cctgataatt cttatggtgg agtgattcat gatctttttc 29580  
 attaagctct gtatgttatt taagtatatt taattccagt aataaaaagg aaatcatcta 29640  
 ggtaccataa tgatagaaat tattcctttt gtggatgatt gtgaatctag attcagggtt 29700  
 ttaaatgaag ggtcgctggg aagtgcgcat atattattcc ttctgaaact 29750

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 200

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

acttccttcg tctgggtggt tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta 60  
 cccgagagac ccggcggtgg ggaagtcact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc 120  
 gccctccgcc tctgttatta gccctcctc ctcgctcggg ccaggaccgg ctctgcgggc 180  
 gccgccaggc ccagaccaag 200

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

ctactatcag aagttgaatt ctaataatta gctattttat aaaggtaacg agaaaaata 60  
 cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat acaaagagtc caaaagttac 120  
 caaaagaact actttccag 139

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 85

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

gatgagctaa taagagcaat tacagctcgc tcagccagac aaaggagttc tgaataactca 60  
 gatgactttg acagtgatga gattg 85

s644PCT88.ST25

<210> 20  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 20  
 tttcttttagg tgatttttct gacacttcag cagatgaaaa ttcagttaat aaaaaaatga 60  
 atgactttca tatatcagat gatgaagaaa agaatccttc aaaactattg tttttgaaaa 120  
 ccaataaatc aaacggtaac ataaccaaag atgagccagt gtgtgccatc aaaaatgaag 180  
 aggaaatggc acctgatggg tgtgaagaca ttgttgtaaa atctttctct gaatctcaaa 240  
 ataaggatga ggaatttgaa aaagacaaaa taaaaatgaa acctaaacc agaattcttt 300  
 caattaaaag cacatcttca g 321

<210> 21  
 <211> 227  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 cagaaaacaa cagccttgac acagatgatc actttaaac atcacctcgg ccaaggagta 60  
 tgttgaaaaa gaaaagtcac atggaggaga aggatggact agaagataaa gaaactgccc 120  
 tcagtgaaga attggagtta cattctgcac cttcttcct tccaacgccg aatggcatac 180  
 aattagaagc tgagaaaaaa gcattctctg aaaaccttga tcctgag 227

<210> 22  
 <211> 94  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 gattcatgct taacaagtct agcatcatca tcacttaaac aaattcttgg agattctttt 60  
 tcaccaggat ctgagggaaa cgcattctgga aaag 94

<210> 23  
 <211> 248  
 <212> DNA

s644PCT88.ST25

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 23  
 atccaaatga agaaatcact gaaaaccata attccttgaa atcagatgaa aataaagaga 60  
 attcattttc agcagaccat gtgactactg cagttgagaa atccaaggaa agtcaagtga 120  
 ctgctgatga ccttgaagaa gaaaaggcaa aagcggaact gattatggat gatgacagaa 180  
 cagttgatcc actactatct aaatctcaga gtatcttaat atctaccagt gcaacagcat 240  
 cttcaaag 248

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 24  
 aaaacaattg aagatagaaa tataaagaat aaaaagtcaa caaataatag agcatccagt 60  
 gcatctgccca g 71

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 169

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 25  
 attaatgacc tctgagtttt tgaagaaatc tagttctaaa aggagaactc catcgacaac 60  
 tacctcttct cactatcttag ggacttttaa agtcttggac caaaaacctt cacagaaaca 120  
 gagcatagaa cctgatagag cagataacat aagggcagct gtttatcag 169

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 90

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 26  
 gagtggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa aagaattgaa 60  
 agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag 90

&lt;210&gt; 27

s644PCT88.ST25

&lt;211&gt; 160

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 27

aaaaaagctg ctaaaagaga agaagcatta gcatcatttg aggcctggaa ggctatgaaa	60
gaaaaggaag caaagaaaat agctgccaaa aagaggcttg aagaaaaaaa caagaagaaa	120
actgaagaag aaaatgctgc aagaaaagga gaagcactac	160

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 146

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

gcttttgaaa aatggaaaga gaaaaagatg gaatatctta aagagaaaaa tagaaaggag	60
agagaatatg aaagagcaaa gaaacagaaa gaggaggaaa ctgttgccga gaaaaagaaa	120
gataatttaa ctgctgttga gaaatg	146

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

gaatgaaaaa aaggaagctt ttttcaagca aaaggaaaaa gaaaaataa atgagaaaag	60
aaaggaagaa ctgaaaagag ctgagaaaaa agataaagat aaacaagcta ttaatgaata	120
tgaaaaatgg ctg	133

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 485

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 30

gaaaaataagg aaaaacaaga aagaattgaa cgaaaacaga agaaacgtca ttcctttctt	60
gaaagtgagg cacttcctcc gtggagccct ccaagcagaa ctgtgttcgc aaaagtgttt	120
tgataattct agttcttaca ttatttggtt atttatcggg ttgccaatat tagccataga	180



## S644PCT88.ST25

ttttaaacc	ttcaattatt	tatagttaga	ggaatatatt	ttaattaaat	gccagacact	240
cctgctgaca	atgaaagaaa	tactttggaa	tgtaatcagt	gaaagcattt	ttttgaactg	300
tagataaact	gcctcaaaca	aagacctaata	aatcagattg	tttttaccat	taagatacat	360
aagattttat	catgtcctga	taattcttat	ggtggagtga	ttcatgatct	ttttcattaa	420
gctctgtatg	ttatttaagt	atatttaatt	ccagtaataa	aaaggaaatc	atctaggtac	480
cataa						485

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 31

atgtctgatg aagtttttag cacc

24

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 32

aggcctcaaa tgatgctaata gc

22

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 33

atcatttgag gcctggaagg c

21

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 34

aaacactttt gcgaacacag ttc

23

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 35

acaacgaata acagagtgtc c

21

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 36

actcctgata aacagctgcc

20

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

s644PCT88.ST25

<400> 37  
gccaccatgt ctgatgaagt ttttagcac 29

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 38  
gaaacacttt tgcgaacaca gttc 24

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 39  
taatgtctga tgaagttttt agcacc 26

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 40  
tcaaaacact tttgcgaaca cagttc 26

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 41

aatgtctgat gaagttttta gcacc

25

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 42

tcagcttgcc gtaggtggc

19

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce

&lt;400&gt; 43

atggtcctgc tggagtctg

19

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 391

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Murinae gen. sp.

&lt;400&gt; 44

aaagaagtga agacagaaac acgaagaata aaaagacaac gaataacaga gtgtccagtg 60

cctctggcag gctgatgacc tctgagtttt taaagagatc cgggtcccaca aaaagaagtc 120

catctgcagc tacctcctca cactatcttag ggagtttgaa agtcttggac cagaagcaac 180

cacggaagca gagccttagag ccagacaagg ctgatcacat aagggcagct gtttatcagg 240

agtggttaga aaagaaaaat gtgtatttac atgaaatgca cagaataaaa agaattgaaa 300

gcgaaaactt gaggatccaa aatgaacaga aaaaagctgc taagagagag gaagccctgg 360

catcatttga ggcctggaag gcaatgaaag a 391

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 2767

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (204)..(2147)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 45

```

gttgggtacc caagagacca ggcggttgga agtcacttcc tcccggggac gctgttgccct      60
agcaaccgcc ttctgcctcc atcttttgcc ccgcctccag gttattccaa tacctggttt      120
cccagaccgc gagggccggg ccgggggcga cacctgtgct agagcatagc cgctgggttc      180
tcagcagaga aaaaggacac acc atg tcc gat gaa atc ttc agc aca act ttg      233
                        Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu
                        1           5           10

gcg tac acc aag agt cca aag gct acc aag aga act tcc ttt cag gat      281
Ala Tyr Thr Lys Ser Pro Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp
                        15           20           25

gag ctg atc aga gcc att aca gcc cgg tca gcc agg cag aga agt tcc      329
Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser
                        30           35           40

gaa tac tcc gat gac ttt gac agt gac gag att gtt tct tta ggt gaa      377
Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu
                        45           50           55

ttt tca gat acc tcg aca gat gaa agt cta gtt aga aaa aag atg aat      425
Phe Ser Asp Thr Ser Thr Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn
                        60           65           70

gat ttt cat ata tcc gac gat gag gaa aaa aat tct cca aga ctg tct      473
Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser
                        75           80           85

ttt ttg aaa acc aag aaa gta aac agg gca ata tcc aac gat gct ctg      521
Phe Leu Lys Thr Lys Lys Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu
                        95           100           105

gac tcc agc act ccg ggc agc gaa ggc tcg tca ccg gat gct caa gaa      569
Asp Ser Ser Thr Pro Gly Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu
                        110           115           120

gat gtg act gga gat tcc ctc ccc aaa tct caa aat gat gat cga gaa      617
Asp Val Thr Gly Asp Ser Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu
                        125           130           135

gtc ggc aga gag atc atc aca gtg aag cct aca ccc agg atg cac ccc      665
Val Gly Arg Glu Ile Ile Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro
                        140           145           150

```

## s644PCT88.ST25

gtc Val 155	aaa Lys	aga Arg	agc Ser	acg Thr	tcc Ser 160	tcg Ser	ggg Gly	gaa Glu	acc Thr 165	agc Ser 165	agc Ser	ggt Gly	ctt Leu	gat Asp	gca Ala 170	713
gat Asp	ggc Gly	cac His	ttt Phe 175	aag Lys 175	cct Pro	tca Ser	ccc Pro	cag Gln 180	cca Pro 180	agg Arg	agc Ser	atg Met	tta Leu	aaa Lys 185	aag Lys	761
agc Ser	agc Ser	cac His	act Thr 190	gag Glu 190	gag Glu	gga Gly	gtc Val	aga Arg 195	cca Pro	gga Gly	gtt Val	gat Asp 200	aaa Lys 200	gaa Glu	cat His	809
tcc Ser	ata Ile 205	agc Ser 205	gaa Glu	gcc Ala	tct Ser	gct Ala	ccc Pro 210	aca Thr	cct Pro	tcc Ser	ctt Leu	cca Pro 215	agg Arg	cag Gln	aat Asn	857
ggc Gly 220	aca Thr 220	gag Glu	ttg Leu	caa Gln	act Thr	gag Glu 225	gaa Glu	aaa Lys	ata Ile	tac Tyr	tcg Ser 230	gaa Glu	aac Asn	ctc Leu	gat Asp	905
ctt Leu 235	gag Glu	gac Asp	tca Ser	ctc Leu	tta Leu 240	caa Gln	agt Ser	ctg Leu	acc Thr 245	tca Ser 245	tct Ser	tcc Ser	ttc Phe	aaa Lys	gaa Glu 250	953
agc Ser	ccc Pro	gga Gly	ggt Gly	tgc Cys 255	aca Thr	tca Ser	cca Pro	gga Gly 260	tct Ser 260	cag Gln	gaa Glu	aag Lys	gtg Val 265	ccc Pro 265	ata Ile	1001
aaa Lys	gat Asp	cat His	gat Asp 270	gga Gly	gaa Glu	cct Pro	act Thr	gaa Glu 275	atc Ile	tgg Trp	gat Asp	tcc Ser 280	ttg Leu 280	cta Leu	tca Ser	1049
aat Asn	gaa Glu	aat Asn 285	gaa Glu	gga Gly	agt Ser	tct Ser	gtt Val 290	ttg Leu	gtg Val	aac Asn	tgt Cys	gtt Val 295	act Thr	cct Pro	gaa Glu	1097
ctc Leu 300	gag Glu	cag Gln	ccc Pro	aag Lys	gac Asp	ggt Gly 305	cag Gln	gtg Val	gca Ala	gct Ala	gac Asp 310	gac Asp	ctt Leu	gag Glu	gaa Glu	1145
gaa Glu 315	aga Arg	gag Glu	aag Lys	ggt Gly	gga Gly 320	ttt Phe	aca Thr	gaa Glu	gat Asp	gac Asp 325	ctc Leu	acc Thr	act Thr	gac Asp	ccg Pro 330	1193
ctg Leu	ctc Leu	tcc Ser	acg Thr 335	tcc Ser 335	ccg Pro	agt Ser	gtc Val	ata Ile 340	aca Thr 340	ccc Pro	act Thr	gag Glu	cca Pro	gca Ala 345	gag Glu	1241
ccg Pro	gcc Ala	aag Lys 350	aaa Lys 350	gca Ala	aat Asn	gaa Glu	gac Asp 355	aga Arg 355	aac Asn	acg Thr	aag Lys	aat Asn 360	aaa Lys 360	aag Lys	aca Thr	1289
acg Thr	aat Asn 365	aac Asn 365	aga Arg	gtg Val	tcc Ser	agt Ser	gcc Ala 370	tct Ser	ggc Gly	agc Ser	agg Arg	ctg Leu 375	atg Met	acc Thr	tct Ser	1337
gag Glu 380	ttt Phe 380	tta Leu	aag Lys	aga Arg	tcc Ser	ggt Gly 385	ccc Pro	aca Thr	aaa Lys	aga Arg 390	agt Ser 390	cca Pro	tct Ser	gca Ala	gct Ala	1385
acc Thr 395	tcc Ser	tca Ser	cac His	tat Tyr	tta Leu 400	ggg Gly	agt Ser	ttg Leu	aaa Lys	gtc Val 405	ttg Leu	gac Asp	cag Gln	aag Lys	caa Gln 410	1433
cca Pro	cgg Arg	aag Lys	cag Gln	agc Ser 415	cta Leu	gag Glu	cca Pro	gac Asp	aag Lys 420	gct Ala	gat Asp	cac His	ata Ile	agg Arg 425	gca Ala	1481

## s644PCT88.ST25

gct gtt tat cag gag tgg tta gaa aag aaa aat gtg tat tta cat gaa Ala Val Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu 430 435 440	1529
atg cac aga ata aaa aga att gaa agc gaa aac ttg agg atc caa aat Met His Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn 445 450 455	1577
gaa cag aaa aaa gct gct aag aga gag gaa gcc ctg gca tca ttt gag Glu Gln Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu 460 465 470	1625
gcc tgg aag gca atg aaa gag aag gaa gca aag aga ata gct gca aaa Ala Trp Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys 475 480 485 490	1673
aag agg ctg gag gaa aag aac aag aag aaa aca gaa gaa gaa aat gcc Lys Arg Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala 495 500 505	1721
atg agg aaa ggc gag gcc ctg caa gca ttt gaa aaa tgg aaa gag aaa Met Arg Lys Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys 510 515 520	1769
aag cta gaa tac ctc aaa gag aag acc agg agg gag aaa gaa tat gaa Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu 525 530 535	1817
aga gca aag aaa cag aaa gaa gag gaa gcg gtt gct gag aaa aag aaa Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys 540 545 550	1865
gac agt tta act gct ttt gaa aaa tgg agt gag aga aag gaa gct ctc Asp Ser Leu Thr Ala Phe Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu 555 560 565 570	1913
ctc aag caa aag gag aag gag aaa ata aat gag aga aga aag gaa gag Leu Lys Gln Lys Glu Lys Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu 575 580 585	1961
ctg aag aga gcc gag aag aaa gac aaa gac aag caa gcc atc agt gaa Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu 590 595 600	2009
tac gaa aag tgg ctg gaa aag aaa gaa agg caa gaa aga att gaa cgg Tyr Glu Lys Trp Leu Glu Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg 605 610 615	2057
aaa cag aag aag cgc cac tcc ttc ctt gag agc gag aca cac cca cca Lys Gln Lys Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro 620 625 630	2105
tgg agt cct ccg agc aga act gcg ccc tca aaa gta ttt tga Trp Ser Pro Pro Ser Arg Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe 635 640 645	2147
tgtttctggt tcttgatttt tttttcagtt caccaactgt actcatggat ttaaaacgag	2207
tcattctcatt atttggtggtt agaagactct atgtcacttc cctgcaggag cttctgtgga	2267
gcatgaaaga gatactttgc agtttaataca gtggaacat tttctgaagt gtcctcatca	2327
gtttgctggg acaatccaga cgcatagaagc tttattatga cctgaacagt ctggtgtggg	2387
gtgattcgtg gtcactgtcg ctgagttcgg agtcttttta aagaatgttt gatcccacta	2447
atgaaagaat gccagctaga taccacaatc gtagagatga ctcggtctgt ggaagtctgt	2507

s644PCT88.ST25

gcttctagag tgtagtttgg gcattgaagg tccctggaga ccatgggcat gttatctctt 2567  
 ctaactccag ttcttcaggt cacagaagta tctttgctgt gcaagttatc gactcagtca 2627  
 gttgaggcca cagaactcta gtcagtcact ttagtaaaga actttgccat agggtttaat 2687  
 ctcggtgtgg ttgaccttct tgaggcttac ctgacaatcg tagccacctc tataatgggc 2747  
 tcacttctgg aatgttcttt 2767

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 647

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 46

Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu Phe Ser Asp Thr Ser Thr  
 50 55 60

Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Lys Thr Lys Lys  
 85 90 95

Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu Asp Ser Ser Thr Pro Gly  
 100 105 110

Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu Asp Val Thr Gly Asp Ser  
 115 120 125

Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu Val Gly Arg Glu Ile Ile  
 130 135 140

Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro Val Lys Arg Ser Thr Ser  
 145 150 155 160

Ser Gly Glu Thr Ser Ser Gly Leu Asp Ala Asp Gly His Phe Lys Pro  
 165 170 175



s644PCT88.ST25

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser Ser His Thr Glu Glu  
 180 185 190

Gly Val Arg Pro Gly Val Asp Lys Glu His Ser Ile Ser Glu Ala Ser  
 195 200 205

Ala Pro Thr Pro Ser Leu Pro Arg Gln Asn Gly Thr Glu Leu Gln Thr  
 210 215 220

Glu Glu Lys Ile Tyr Ser Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asp Ser Leu Leu  
 225 230 235 240

Gln Ser Leu Thr Ser Ser Ser Phe Lys Glu Ser Pro Gly Gly Cys Thr  
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Gln Glu Lys Val Pro Ile Lys Asp His Asp Gly Glu  
 260 265 270

Pro Thr Glu Ile Trp Asp Ser Leu Leu Ser Asn Glu Asn Glu Gly Ser  
 275 280 285

Ser Val Leu Val Asn Cys Val Thr Pro Glu Leu Glu Gln Pro Lys Asp  
 290 295 300

Gly Gln Val Ala Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Arg Glu Lys Gly Gly  
 305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Asp Leu Thr Thr Asp Pro Leu Leu Ser Thr Ser Pro  
 325 330 335

Ser Val Ile Thr Pro Thr Glu Pro Ala Glu Pro Ala Lys Lys Ala Asn  
 340 345 350

Glu Asp Arg Asn Thr Lys Asn Lys Lys Thr Thr Asn Asn Arg Val Ser  
 355 360 365

Ser Ala Ser Gly Ser Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Arg Ser  
 370 375 380

Gly Pro Thr Lys Arg Ser Pro Ser Ala Ala Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Ser Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Gln Pro Arg Lys Gln Ser Leu  
 405 410 415

Glu Pro Asp Lys Ala Asp His Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445

s644PCT88.ST25

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys  
 465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys  
 485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Met Arg Lys Gly Glu Ala  
 500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Leu Glu Tyr Leu Lys  
 515 520 525

Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys  
 530 535 540

Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Ser Leu Thr Ala Phe  
 545 550 555 560

Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Glu Lys  
 565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys  
 580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu  
 595 600 605

Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His  
 610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg  
 625 630 635 640

Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe  
 645

<210> 47

<211> 647

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 47

Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
                   20                  25                  30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
                   35                  40                  45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu Phe Ser Asp Thr Ser Thr  
                   50                  55                  60

Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
                   65                  70                  75                  80

Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Lys Thr Lys Lys  
                   85                  90                  95

Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu Asp Ser Ser Thr Pro Gly  
                   100                  105                  110

Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu Asp Val Thr Gly Asp Ser  
                   115                  120                  125

Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu Val Gly Arg Glu Ile Ile  
                   130                  135                  140

Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro Val Lys Arg Ser Thr Ser  
                   145                  150                  155                  160

Ser Gly Glu Thr Ser Ser Gly Leu Asp Ala Asp Gly His Phe Lys Pro  
                   165                  170                  175

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser Ser His Thr Glu Glu  
                   180                  185                  190

Gly Val Arg Pro Gly Val Asp Lys Glu His Ser Ile Ser Glu Ala Ser  
                   195                  200                  205

Ala Pro Thr Pro Ser Leu Pro Arg Gln Asn Gly Thr Glu Leu Gln Thr  
                   210                  215                  220

Glu Glu Lys Ile Tyr Ser Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asp Ser Leu Leu  
                   225                  230                  235                  240

Gln Ser Leu Thr Ser Ser Ser Phe Lys Glu Ser Pro Gly Gly Cys Thr  
                   245                  250                  255

Ser Pro Gly Ser Gln Glu Lys Val Pro Ile Lys Asp His Asp Gly Glu  
                   260                  265                  270

Pro Thr Glu Ile Trp Asp Ser Leu Leu Ser Asn Glu Asn Glu Gly Ser  
                   275                  280                  285

s644PCT88.ST25

Ser Val Leu Val Asn Cys Val Thr Pro Glu Leu Glu Gln Pro Lys Asp  
 290 295 300

Gly Gln Val Ala Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Arg Glu Lys Gly Gly  
 305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Asp Leu Thr Thr Asp Pro Leu Leu Ser Thr Ser Pro  
 325 330 335

Ser Val Ile Thr Pro Thr Glu Pro Ala Glu Pro Ala Lys Lys Ala Asn  
 340 345 350

Glu Asp Arg Asn Thr Lys Asn Lys Lys Thr Thr Asn Asn Arg Val Ser  
 355 360 365

Ser Ala Ser Gly Ser Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Arg Ser  
 370 375 380

Gly Pro Thr Lys Arg Ser Pro Ser Ala Ala Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Ser Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Gln Pro Arg Lys Gln Ser Leu  
 405 410 415

Glu Pro Asp Lys Ala Asp His Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys  
 465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys  
 485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Met Arg Lys Gly Glu Ala  
 500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Leu Glu Tyr Leu Lys  
 515 520 525

Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys  
 530 535 540

Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Ser Leu Thr Ala Phe  
 545 550 555 560

s644PCT88.ST25

Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Glu Lys  
 565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys  
 580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu  
 595 600 605

Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His  
 610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg  
 625 630 635 640

Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe  
 645

<210> 48

<211> 344

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> HASAP peptide mutant 411-647

<400> 48

Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys  
 20 25 30

Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys  
 35 40 45

Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg  
 50 55 60

Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys  
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr  
 85 90 95

Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser  
 100 105 110

s644PCT88.ST25

Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu  
 115 120

Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys  
 130 135 140

Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala  
 145 150 155 160

Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met  
 165 170 175

Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu  
 180 185 190

Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu  
 195 200 205

Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu  
 210 215 220

Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln  
 225 230 235 240

Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala  
 245 250 255

Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys  
 260 265 270

Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu  
 275 280 285

Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu  
 290 295 300

Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg  
 305 310 315 320

His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser  
 325 330 335

Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 340

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

.s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 411-647

&lt;400&gt; 49

Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala  
 1 5 10 15

Ala Val Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu  
 20 25 30

Met His Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn  
 35 40 45

Glu Gln Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu  
 50 55 60

Ala Trp Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys  
 65 70 75 80

Lys Arg Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala  
 85 90 95

Ala Arg Lys Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys  
 100 105 110

Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu  
 115 120 125

Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys  
 130 135 140

Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe  
 145 150 155 160

Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu  
 165 170 175

Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu  
 180 185 190

Tyr Glu Lys Trp Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg  
 195 200 205

Lys Gln Lys Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro  
 210 215 220

Trp Ser Pro Pro Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 225 230 235

s644PCT88.ST25

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 170

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 478-647

&lt;400&gt; 50

Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu  
 1 5 10 15

Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys  
 20 25 30

Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu  
 35 40 45

Tyr Leu Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys  
 50 55 60

Lys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu  
 65 70 75 80

Thr Ala Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln  
 85 90 95

Lys Lys Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg  
 100 105 110

Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys  
 115 120 125

Trp Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys  
 130 135 140

Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro  
 145 150 155 160

Pro Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe  
 165 170

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 477

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial sequence



s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 1-477

&lt;400&gt; 51

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
 50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
 85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
 100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
 115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
 130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
 145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
 165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
 180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
 195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
 210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
 225 230 235 240

s644PCT88.ST25

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
 260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
 275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu  
 290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu  
 305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser  
 325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr  
 340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala  
 355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser  
 370 375 380

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile  
 405 410 415

Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp  
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg  
 435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala  
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys  
 465 470 475

<210> 52

<211> 418

<212> PRT

<213> artificial sequence

s644PCT88.ST25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hASAP mutant 1-418

&lt;400&gt; 52

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
 50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
 85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
 100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
 115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
 130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
 145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
 165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
 180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
 195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
 210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
 225 230 235 240

s644PCT88.ST25

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
 260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
 275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu  
 290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu  
 305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser  
 325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr  
 340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala  
 355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser  
 370 375 380

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu  
 385 390 395 400

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile  
 405 410 415

Glu Pro

<210> 53

<211> 303

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> hASAP mutant 1-303

<400> 53

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro  
 1 5 10 15

S644PCT88.ST25

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile  
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe  
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala  
 50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp  
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys  
 85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn  
 100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser  
 115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile  
 130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser  
 145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro  
 165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp  
 180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His  
 195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala  
 210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu  
 225 230 235 240

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe  
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu  
 260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn  
 275 280 285

s644PCT88.ST25

Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	His	Val	Thr	Thr	Ala	Val	Glu	Lys	Ser	Lys
290						295					300			